



TESIS DOCTORAL

Resistencia frente a los antimicrobianos de mayor
interés clínico en cepas de *Campylobacter* aisladas
del hombre y los animales

Lorena Hormeño García

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

Conformidad de los Directores:

Fdo: Alberto Quesada Molina

Fdo: Segundo Píriz Durán

2016

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores. A Segundo por ser el albor de todo, porque fue él quien me propuso comenzar la tesis en aquella asignatura, hoy extinta, llamada Microbiología Especial. A Alberto, por estar ahí desde el primer día, por su seguimiento continuo, por sus explicaciones, por su ayuda, por hacer que nunca me haya sentido perdida en este insondable mundo de la Investigación. Por todo, Gracias.

Al departamento de Microbiología. A Santiago Vadillo, que pese a no compartir línea de investigación, ha contribuido enormemente a mi desarrollo profesional y personal, gracias por sus buenos consejos y por el cariño mostrado. A Jorge Valle y Emilio Mateo, por su amabilidad y ánimo. A Gonzalo, porque fue él quien me enseñó a “cacharrear” en el laboratorio y del que tanto aprendí, de la ciencia y de la vida. A Eulogio, por su cercanía desde el minuto cero, por su conversación amiga y por compartir décimos de lotería que estoy convencida, algún día estarán premiados. A María Jorge y Santiago Barquilla, por su ayuda con los experimentos finales. A Carlos y Marta por su compañía en el laboratorio. A Inma, por su preciada ayuda burocrática e informativa. A Marisa, porque aunque no comenzamos el camino a la vez, se puede decir que hemos recorrido gran parte del mismo juntas, le doy gracias por su ayuda, por resolver mis interminables dudas, por estar ahí codo con codo.

Al servicio de Microbiología de los Hospitales Universitario de Salamanca, San Pedro de Alcántara de Cáceres y Campo Arañuelo de Navalmoral de la Mata, en especial a Elías, Pedro y Jesús. Gracias porque sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A VISAVET (Universidad Complutense de Madrid) por las cepas animales aportadas y por su trato exquisito durante mi estancia en su centro. En especial a María Ugarte, por enseñarme a tratar a nuestros amigos “los campys” como se merecen.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, por las muestras aviares.

A mis amigos, los de la carrera: Javi, Sergio, Alfonso, Eulogio, Elisa, Leticia. A “las de siempre” como tanto me gusta llamarlas: Rosa, Mónica, Lucía, Vanesa, Male, Melani. Gracias por estar, ser siempre motivo de despeje, y hacer que me sienta afortunada por vuestra amistad.

A mi familia, el mejor de los tesoros. A mis padres, por su ejemplo de trabajo incansable, por haber querido siempre lo mejor para mi hermano y para mí, por inculcarnos la humildad, por darnos todo y por querernos como nos quieren, gracias de corazón. A mi hermano, el niño pequeño que hoy es todo un hombre, gracias por ser como es, una persona íntegra, con tantos valores, me siento tan orgullosa de tenerle, gracias por sus ánimos. A mi tío, soy una suertuda por ser su sobrina, gracias por ser y estar, en las duras y en las maduras, sin duda es un regalo. A mis abuelos, los que están, que sé el orgullo que les supone, gracias por vuestro amor puro e incondicional. Al que se fue, pero seguirá estando siempre, que no me cabe la menor duda de que es el que más contento está, gracias por el recuerdo y cariño que dejó y gracias a Dios por haberme permitido disfrutar de él, la mejor persona que he conocido, durante 22 años.

A mi ahijado, que tantas alegrías me da.

A Francisco, por ser el mejor compañero de vida, por ser como es, por sus cuidados, su inestimable e interminable ayuda, su paciencia, su amor, su entrega...Infinitas gracias.

A los que no menciono, por despiste, y han contribuido al desarrollo del presente trabajo, que me disculpen.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Introducción..... | 14 |
| 1.1. Importancia de la campilobacteriosis en la salud pública..... | 16 |
| 1.2 Agente etiológico..... | 17 |
| 1.2.1 Taxonomía..... | 17 |
| 1.2.2 Fisiología..... | 17 |
| 1.2.3 Patogénesis y síntomas clínicos..... | 18 |
| 1.2.4 Epidemiología. Vías de transmisión..... | 19 |
| 1.2.5 Identificación..... | 20 |
| 1.2.6 Tratamiento..... | 20 |
| 1.3 Resistencia a los antimicrobianos en <i>Campylobacter</i> | 20 |
| 1.3.1 Uso de los antimicrobianos y resistencia bacteriana..... | 21 |
| 1.3.2 Mecanismos de resistencia..... | 23 |
| 1.3.2.1 Transferencia horizontal..... | 24 |
| 1.3.2.2 Resistencia frente a quinolonas..... | 25 |
| 1.3.2.3 Resistencia frente a tetraciclinas..... | 27 |
| 1.3.2.4 Resistencia frente a aminoglicósidos..... | 28 |
| 1.3.2.5 Resistencia frente a macrólidos..... | 29 |
| 2. Objetivos..... | 32 |
| 3. Material y Métodos..... | 36 |
| 3.1 Material biológico..... | 38 |
| 3.1.1 Medio de aislamiento..... | 38 |
| 3.1.2 Medio de crioconservación..... | 38 |
| 3.1.3 Medio de enriquecimiento..... | 38 |
| 3.1.4 Medio de transporte..... | 38 |
| 3.1.5 Identificación de las cepas..... | 39 |
| 3.1.6 Estudio fenotípico de la sensibilidad antimicrobiana..... | 39 |
| 3.1.6.1 El método de la microdilución en agar..... | 39 |
| 3.1.6.2 Inoculación de cepas..... | 40 |
| 3.1.7 Conjugación de <i>Campylobacter</i> | 41 |
| 3.1.8 Transformación..... | 41 |
| 3.1.9 Extracción de DNA genómico..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.1.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 43 |
| 3.1.11 Preparación de geles de agarosa y separación electroforética del DNA | 44 |
| 3.1.12 Clonación de fragmentos de PCR | 47 |
| 3.1.13 Purificación de Productos de PCR | 47 |
| 3.1.14 Secuenciación y análisis de resultados | 47 |
| 4. Resultados I. Análisis Microbiológico y fenotípico de los aislados de <i>Campylobacter</i> | 48 |
| 4.2 Resistencia frente a los antimicrobianos..... | 50 |
| 5. Resultados II. Análisis de los determinantes de resistencia a la tetraciclina de los aislados de <i>Campylobacter</i> | 56 |
| 5.1 Puesta a punto de la PCR para la identificación de tetO | 58 |
| 5.2 Escrutinio de tetO mediante cebadores específicos entre las cepas de <i>Campylobacter</i> | 60 |
| 5.3 Escrutinio de genes de la familia tet mediante cebadores degenerados entre las cepas de <i>Campylobacter</i> | 62 |
| 5.4 Análisis comparativo de las secuencias de genes tet identificados entre las cepas de <i>Campylobacter</i> | 64 |
| 5.5 Transferencia horizontal de genes tet identificados en las cepas de <i>Campylobacter</i> | 67 |
| 6. Resultados III. Análisis de los determinantes de resistencia a la ciprofloxacina de los aislados de <i>Campylobacter</i> | 68 |
| 6.1 Puesta a punto de la PCR para la identificación de la mutación C-257-T de gyrA | 70 |
| 6.2 Escrutinio del genotipo C-257-T de gyrA entre las cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas de infecciones en humanos | 74 |
| 6.3 Escrutinio del genotipo C-257-T de gyrA en cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas de animales..... | 77 |
| 7. Resultados IV. Análisis de los determinantes de resistencia a la estreptomicina de los aislados de <i>Campylobacter</i> | 80 |
| 7.1 Ámbito de estudio: determinantes de resistencia a la estreptomicina | 82 |
| 7.2 Polimorfismo de la proteína RpsL (L12)..... | 82 |
| 7.3 Escrutinio de la familia ANT(3'') en <i>Campylobacter</i> | 84 |
| 7.4 La familia ANT(6) en <i>Campylobacter</i> | 84 |
| 7.5 Escrutinio de genes ant(6) entre las cepas de <i>Campylobacter</i> | 85 |
| 7.6 Análisis comparativo de las secuencias de genes ant(6)-Ie identificados entre las cepas de <i>Campylobacter</i> | 90 |
| 7.7 Expresión funcional de ant(6)-Ie en <i>Escherichia coli</i> | 92 |
| 8. Discusión..... | 94 |

| | |
|---|-----|
| 8.1 Caracterización fenotípica de las cepas de <i>Campylobacter</i> | 96 |
| 8.2 Análisis de la resistencia a la tetraciclina..... | 98 |
| 8.3 Análisis de la resistencia a la ciprofloxacina | 100 |
| 8.4 Análisis de la resistencia a la estreptomycin..... | 103 |
| 8.5 Conclusiones | 106 |
| 9. Bibliografía. | 108 |

1.Introducción.

1.1 Importancia de la campilobacteriosis en la salud pública.

Las zoonosis alimentarias se han convertido en un grave problema para la Salud Pública en países desarrollados dadas las enormes pérdidas económicas, sanitarias, laborales y de bienestar que provocan en la población. Por este motivo los diferentes países se esfuerzan en controlarlas. Un total de 5,196 brotes alimenticios fueron declarados en la UE en 2013. El mayor porcentaje de éstos fue causado por *Salmonella* (22.5 %), seguido de virus (18.1%), toxinas bacterianas (16.1 %) y *Campylobacter* (8.0 %). El 28.9 % fueron de causa desconocida (EFSA, 2015).

La campilobacteriosis humana es una enfermedad infectocontagiosa producida por bacterias termotolerantes del género *Campylobacter*, cuya dosis infectiva es generalmente baja. Las especies comúnmente más asociadas con infecciones humanas son *Campylobacter jejuni* seguido de *Campylobacter coli*, y *Campylobacter lari*, pero otras especies de *Campylobacter* también se sabe que causan infección en humanos (Man, 2011). Las especies termófilas de *Campylobacter*, particularmente *C. jejuni* y *C. coli*, han sido reconocidas como una grave causa de gastroenteritis aguda bacteriana en humanos desde finales de los años 70 y se estima que estas especies producen 400-500 millones de casos de diarrea cada año en todo el mundo (Ruiz-Palacios, 2007), incluyendo la causa más común de la denominada diarrea del viajero, muy frecuente en los países desarrollados (Allos, 2001), aunque *C.jejuni* es la especie más aislada en los casos de infecciones humanas (Padungton and Kaneene, 2003). En la UE, esta enfermedad es la zoonosis más prevalente desde 2005, con 214,779 casos confirmados de campilobacteriosis humana en 2013, cuya tendencia alcista parece haberse estabilizado en los últimos años del estudio (EFSA, 2015). En Estados Unidos se ha estimado en más de dos millones de casos anuales la incidencia de la campilobacteriosis humana (Mead et al., 1999), detectándose un incremento del 14% en los casos producidos por *C. jejuni* en 2012, según datos del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC). En otras zonas geográficas, como Nueva Zelanda en 2010, también hay elevados índices de campilobacteriosis, registrándose en ese país un pico máximo en mayo de 2006 con 400 casos por 100.000

personas. En general, los países en vías de desarrollo no tienen programas de vigilancia de campilobacteriosis, por lo tanto no existen valores de su incidencia en términos de densidad de población (Epps et al., 2013).

1.2 Agente etiológico.

1.2.1 Taxonomía

El género *Campylobacter* fue introducido en 1963 (Sebald and Veron, 1963) para diferenciarlos de los miembros del género *Vibrio*. Actualmente el género *Campylobacter*, junto a los géneros *Arcobacter* y *Sulfurospirillum* constituyen la familia *Campylobacteraceae*, la cual se encuentra dentro del orden *Campylobacterales* que pertenece a las *Epsilonproteobacterias* (Garrity et al. 2005). Este género consta de 23 especies reconocidas, varias de ellas pueden causar enfermedades reproductivas y gastrointestinales en el hombre y los animales. Otras especies son bacterias comensales del tracto gastrointestinal del hombre, animales domésticos, mamíferos salvajes, pájaros y moluscos (McVey et al. 2013).

1.2.2 Fisiología

Las células de la mayoría de la especies son esbeltas, bacilos curvados en espiral de unos 0.2-0.8 X 0.5-5 μm ; algunas especies son predominantemente bacilos rectos o curvados. Los bacilos pueden tener una o más espirales y pueden llegar a superar los 8 μm . También aparecen formas en S o en alas de gaviota cuando dos células forman una pequeña cadena. Son no formadoras de esporas. En cultivos viejos pueden llegar a adoptar formas esféricas o cocoides. Las células tienen una membrana polar multilaminar en ambos extremos de la célula y está localizada bajo la membrana citoplasmática. Son Gram negativas. Tienen un tipo de motilidad característico que recuerda a un sacacorchos mediado por un flagelo descubierto en uno o ambos extremos de la bacteria. El flagelo puede superar dos o tres veces la longitud de la célula (Garrity et al. 2005). Son microaerófilos, requieren una atmósfera que contenga una concentración de oxígeno entre el 3% y el 10% y una concentración de dióxido de carbono de 3-15%. Todas las especies crecen a 37° C, pero algunas como *C.jejuni*, *C.coli* y

C. lari, son termotolerantes y crecen bien a 42° C. A diferencia de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son oxidasa positivos. No fermentan ni oxidan los hidratos de carbono, la energía es obtenida de la oxidación de los aminoácidos o de los ácidos tricarboxílicos (McVey et al. 2013). *C. jejuni* utiliza los aminoácidos disponibles en orden secuencial, con preferencia por serina, aspartato, asparragina y glutamato y se ha descrito que algunas cepas de *Campylobacter jejuni* metabolizan prolina, pero solo cuando las otras fuentes de aminoácidos han sido agotadas completamente (Epps et al., 2013).

1.2.3 Patogénesis y síntomas clínicos

Campylobacter se adhiere e invade las células epiteliales del intestino delgado distal y colon. Las bacterias se desplazan a través del epitelio a la lámina propia. Esta invasión daña el epitelio e induce hemorragia e inflamación con reclutamiento de neutrófilos y producción de interleucinas y prostaglandinas (McVey et al. 2013). Una serie de estudios a partir de biopsias humanas y animales han demostrado que *Campylobacter* es capaz de cruzar la barrera epitelial intestinal y llegar a los tejidos subyacentes, torrente sanguíneo e incluso otros órganos (Backert et al., 2013). Se ha visto que motilidad y quimiotaxis son esenciales para la colonización del intestino y podrían contribuir a la virulencia (Takata et al., 1992).

Los síntomas clínicos incluyen fiebre, calambres abdominales (McVey et al. 2013), van desde una leve diarrea acuosa a una diarrea profusa con sangre y leucocitos en las heces (Allos and Blaser, 1995), existiendo daño e inflamación en la mucosa, especialmente del íleo y yeyuno (Wassenaar and Blaser, 1999). En los países no desarrollados, la diarrea asociada a la infección por *Campylobacter* spp. sólo aparece, normalmente, en niños menores de dos años, siendo a partir de ahí asintomática la infección. La razón de esta desigualdad no está clara pero refleja las diferencias existentes en el estado inmune de los individuos de unos países y otros (Dworkin et al, 2006).

La enfermedad intestinal puede ir acompañada por bacteriemia e infección sistémica, especialmente en personas de avanzada edad o inmunodeprimidos. Una importante secuela de las infecciones por *C. jejuni* es el

desarrollo del Síndrome Guillain-Barré, cuyos síntomas se hacen evidentes a los 7-21 días tras el inicio de la infección (Nachamkin et al., 1998).

El Síndrome Guillain-Barré es una enfermedad autoinmune rara que se caracteriza por desmielinización de los nervios motores y sensoriales o deterioro de los axones de los nervios del sistema nervioso periférico. Este daño puede dar lugar a debilidad muscular, parálisis y muerte. Se ha descrito que el Síndrome Guillain-Barré se ha convertido en la causa más frecuente de parálisis flácida aguda desde la eliminación de la poliomielitis en el mundo. El Síndrome Miller-Fischer es un subtipo del anterior que se caracteriza por arreflexia, ataxia y oftalmoplegia. Hay estudios que indican que infecciones por *C.jejuni* preceden un 20-50% de los casos de Síndrome Guillain-Barré en Europa, USA, Sudamérica, Japón y Australia (Epps et al., 2013).

1.2.4 Epidemiología. Vías de transmisión

Campylobacter spp. coloniza los intestinos de los animales de abasto, y puede contaminar la carne durante el procesado (Hermans et al., 2012). El consumo de carne contaminada de cerdo o pollo está considerado como un factor de riesgo para la campilobacteriosis en humanos (Hermans et al., 2012, Callicott et al., 2008). También se consideran fuentes de estos microorganismos leche sin pasteurizar y productos lácteos, agua de bebida y contacto con animales (Altekruse and Tollefson, 2003, Allos, 2001). La contaminación cruzada durante la preparación de la comida en casa también ha sido descrita como una importante ruta de transmisión (EFSA, 2013).

Los factores de virulencia son: motilidad, resistencia a antibióticos, adherencia a las células del huésped, invasión de las células, alteración de las vías de señalización de la célula, inducción de la muerte celular, evasión del sistema inmune y adquisición de hierro como micronutriente. También es sabido que *C.jejuni* secreta proteínas que contribuyen a la habilidad de la bacteria para invadir las células epiteliales. La supervivencia en el huésped depende de varias respuestas de adaptación incluyendo adherencia, secreción de proteínas, invasión y replicación (Epps et al., 2013).

1.2.5 Identificación

Existen distintos métodos de identificación, como las tradicionales pruebas bioquímicas, PCR simples y PCR múltiples que permiten identificar hasta 6 especies distintas de *Campylobacter* en una sola prueba (Yamazaki-Matsune et al., 2007, Ugarte-Ruiz et al., 2012). En los últimos tiempos se está utilizando la espectrometría de masas MALDI-TOF como un método, más eficiente que los convencionales, para la identificación de especies de *Campylobacter*, permitiendo ahorro de tiempo y dinero (Bessede et al., 2011).

1.2.6 Tratamiento

Las infecciones por *Campylobacter* suelen ser autolimitantes y no requieren tratamiento. En caso de que éste sea necesario, la fluidoterapia es lo más importante. El tratamiento antibiótico solo es necesario en aquellos casos en los que la enfermedad es más severa y persistente o en niños, mujeres embarazadas, ancianos y pacientes inmunodeprimidos (Wieczorek and Osek, 2013, Allos, 2001). Macrólidos y fluoroquinolonas son los agentes antimicrobianos de elección cuando es necesario llevar a cabo una intervención terapéutica, habiendo sido en el pasado estas últimas los antimicrobianos considerados útiles para la profilaxis de la diarrea del viajero (Taylor et al., 1991). Las tetraciclinas también han sido sugeridas como una alternativa de elección en el tratamiento de campilobacteriosis clínica (Moore et al., 2006). Por último, los aminoglicósidos intravenosos están indicados para los casos más graves de infecciones por *Campylobacter*, como bacteriemias y otras infecciones sistémicas (Aarestrup and Engberg, 2001).

1.3 Resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter*

Hoy en día existe una gran preocupación científica y social por el constante incremento de bacterias resistentes a los antibióticos, siendo particularmente alarmante la emergencia y diseminación de resistencias en las bacterias de carácter zoonótico, debido a su impacto en la salud pública.

De hecho, la resistencia a los antimicrobianos, tanto en medicina como en agricultura, ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud, junto con otras autoridades, como un grave problema de salud pública. Lo que

representa un gran desafío de dimensiones globales en medicina humana y veterinaria (Moore et al., 2006).

1.3.1 Uso de los antimicrobianos y resistencia bacteriana

El descubrimiento de los antibióticos ha sido uno de los logros más importantes del siglo XX y ha aportado grandes ventajas al bienestar y a la salud del hombre y de los animales. Tras el descubrimiento de la penicilina, en 1929, la Humanidad comenzó a hacer un uso creciente de los antimicrobianos. Se inició así la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, caracterizada por una enorme disminución de la morbilidad y de la mortalidad para muchas enfermedades infecciosas.

A pesar de ello, la utilización de los antimicrobianos no está exenta de problemas. A las posibles reacciones de toxicidad, hay que añadir el riesgo de la presencia de residuos medicamentosos en los productos de origen animal y sus consecuencias para la salud pública. Sin embargo, el mayor inconveniente está relacionado con la emergencia de bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos de uso clínico. Esto se debe a que los antibióticos utilizados, tanto en medicina humana como en veterinaria, ejercen una presión de selección sobre el ecosistema bacteriano, pudiendo ocasionar la aparición de microorganismos resistentes (van den Bogaard, 1997, van den Bogaard and Stobberingh, 1999). Una consecuencia directa de este hecho es el fallo terapéutico en la lucha contra las enfermedades infecciosas, tanto en el hombre como en los animales, que conlleva un incremento del coste de los tratamientos y la ausencia de alternativas terapéuticas en algunos casos (Vidal, 2005).

En medicina humana el uso de los antibióticos es fundamentalmente terapéutico. Sin embargo, en producción animal, también se emplean como profilácticos, para la prevención de infecciones bacterianas, y como promotores del crecimiento, para acelerar la ganancia de peso y mejorar los índices de transformación de los alimentos (Cancho *et al.*, 2000).

La prevalencia de *Campylobacter* spp. resistentes está incrementando mundialmente, lo que se está convirtiendo en un grave problema para la salud

pública (Moore et al., 2006). Desde que la campilobacteriosis es una enfermedad zoonótica, la presencia de cepas resistentes en la cadena alimentaria también tiene influencia en las infecciones humanas. Uno de los principales factores que influyen en las resistencias antimicrobianas, especialmente a fluoroquinolonas y macrólidos, es el uso de estos agentes antimicrobianos en producción animal. El inicio de administración de las fluoroquinolonas, concretamente la enrofloxacin, en ganadería comenzó a principios de los noventa en países de Asia y Europa como Suecia, Holanda y España, coincidiendo con las primeras resistencias a fluoroquinolonas en humanos en estos países (Endtz et al., 1991). En Reino Unido, la resistencia a fluoroquinolonas en aislados de *Campylobacter* fue observada después de que se aprobara el uso de estos compuestos como promotores del crecimiento en medicina veterinaria (Sam et al., 1999). En los Estados Unidos, la introducción de sarafloxacin y enrofloxacin a mediados de los noventa como promotores del crecimiento en pollos también contribuyó a la resistencia a las fluoroquinolonas, ya que la resistencia de aislados de *Campylobacter* en humanos aumentó de un 1.3% en 1992 a un 10.2% en 1998 (Nachamkin et al., 2002). En algunos países, donde el uso de fluoroquinolonas en producción animal es bajo, la incidencia de cepas resistentes permanece moderada o baja (Wieczorek and Osek, 2013), como es el caso de Australia, donde la prohibición del uso de fluoroquinolonas en animales de producción se relaciona con la susceptibilidad generalizada a la ciprofloxacina de las cepas de *Campylobacter* aisladas de cerdos (Hart et al., 2004). Éste es también el caso de los macrólidos, cuyo uso en producción animal como agentes terapéuticos o promotores del crecimiento ha sido considerado como uno de los factores importantes en la selección de cepas de *Campylobacter* resistentes a eritromicina (Wieczorek and Osek, 2013).

La resistencia a fluoroquinolonas puede aparecer durante el tratamiento con este antimicrobiano (Adler-Mosca et al., 1991). Así, se ha comprobado que un 10% de los pacientes de enteritis por *Campylobacter* tratados con fluoroquinolonas albergaban cepas de *Campylobacter* resistentes a quinolonas (Endtz et al., 1991). El desarrollo de la resistencia ocurre durante las primeras

24 h del tratamiento, aunque los tratamientos prolongados, especialmente en inmunodeprimidos, son también un factor de riesgo (Engberg et al., 2001).

Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos por mutaciones y transferencia horizontal de genes (Jeon et al., 2008). Además pueden conferirse resistencias por las bombas de eflujo, que limitan el acceso de los antimicrobianos a sus dianas bombeando estas moléculas al exterior celular, evitando así la acumulación letal de dichos compuestos. En *Campylobacter* han sido caracterizados los sistemas de eflujo CmeABC y CmeDEF (Akiba et al., 2006, Lin et al., 2002).

1.3.2 Mecanismos de resistencia

Una bacteria se considera resistente a un antimicrobiano cuando una concentración determinada de esta sustancia no es lo suficientemente alta como para inhibir su multiplicación. Una cepa bacteriana resistente difiere de una cepa sensible en la capacidad que tiene para inactivar el agente antimicrobiano o evitar su efecto dañino. Hay tres mecanismos básicos por los que las bacterias sensibles pueden llegar a ser resistentes a los antimicrobianos (Davies, 1994):

- a) **Inactivación enzimática del antimicrobiano:** Este mecanismo consiste en la inhibición del antimicrobiano mediante la producción por parte de la bacteria de enzimas como las beta-lactamasas (que inactivan a los beta-lactámicos) y las transferasas (actúan contra los aminoglicósidos).
- b) **Reducción de la acumulación intracelular del antimicrobiano:** Las bacterias tienen mecanismos activos para expulsar los antimicrobianos de su citoplasma (bombas de eflujo) o simplemente pueden alterar los mecanismos de transporte y la permeabilidad de su membrana.
- c) **Cambios en el sitio de actuación del antimicrobiano en la célula bacteriana:** Cuando ocurren cambios en la diana o punto de actuación del antimicrobiano que bloquean su acción.

La resistencia antimicrobiana está codificada en genes de resistencia, que pueden ser transmitidos de unas bacterias a otras verticalmente o bien horizontalmente a través de elementos genéticos móviles. En algunos casos, la

resistencia a un mismo antimicrobiano puede ser determinada en una gran variedad de bacterias, mientras que otros parecen ser específicos de género y especie.

1.3.2.1 Transferencia horizontal

La transferencia horizontal de genes es llevada a cabo por transducción, conjugación y transformación natural (Normark and Normark, 2002). La transducción se lleva a cabo por la actuación de bacteriófagos, mientras que la conjugación se realiza mediante plásmidos y requiere contacto entre células (Frost et al., 2005, Summers, 2006). La transformación natural no requiere bacteriófagos ni contacto celular, conlleva la absorción del DNA libre por algunas especies bacterianas competentes y posteriormente la recombinación e incorporación del DNA en el cromosoma receptor (Chen et al., 2005, Dubnau and Provvedi, 2000, Summers, 2006). La mayoría de las bacterias están capacitadas para desarrollar al menos uno de los mecanismos de transferencia horizontal de material genético (Summers, 2006).

En *Campylobacter* ocurren, con una alta eficiencia, la conjugación y la transformación natural (Taylor et al., 1981, Wang and Taylor, 1990). La transferencia de la resistencia antimicrobiana por conjugación, sobre todo tetraciclina, fue descrita en *Campylobacter* en medios de cultivo y en animales infectados (Avrain et al., 2004, Pratt and Korolik, 2005, Taylor et al., 1981, Velazquez et al., 1995). La transformación natural es bien conocida en *Campylobacter* y ha facilitado la manipulación genética de cepas con fines científicos (Guerry et al., 1994). La competencia natural de *Campylobacter* está extensamente considerada como un importante mecanismo para generar diversidad genética en estas bacterias por mediación de la transferencia horizontal de genes (de Boer et al., 2002, Dorrell et al., 2001). Parece ser que tanto la conjugación como la transformación natural tienen un papel importante en la transferencia de determinantes de resistencia en *Campylobacter*. También han sido descritas infecciones de bacteriófagos en distintas cepas de este género (Atterbury et al., 2003, Khakhria and Lior, 1992), pero su rol en la transferencia horizontal de genes en *Campylobacter* es desconocido (Jeon et al., 2008, Luangtongkum et al., 2009). Integrones y elementos genéticos

móviles, como trasposones, no son muy comunes en *Campylobacter* y no parecen tener una relevancia importante en la transferencia horizontal de resistencias en estas bacterias (Luangtongkum et al., 2009).

Campylobacter puede adquirir determinantes de resistencia tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Lee et al., 1994)

1.3.2.2 Resistencia frente a quinolonas

Las quinolonas de uso clínico están clasificadas en cuatro generaciones, en función de su estructura y espectro de actividad. La segunda generación incluye las fluoroquinolonas (entre ellas la ciprofloxacina), que son derivadas de los primeros compuestos mediante la incorporación de flúor en la posición 6, lo que aumenta su actividad contra las bacterias Gram-negativas. Lo mismo ocurre con la tercera generación, donde sustituciones en las posiciones 7 y 8 provocan una sustancial mejora de la actividad contra las bacterias Gram-positivas (Payot et al., 2006).

Las quinolonas inhiben la síntesis de DNA bacteriano causando muerte celular. Las dianas de estos agentes antimicrobianos son dos enzimas bacterianas: DNA girasa y topoisomerasa IV, cada una compuesta por dos subunidades. Las subunidades de la DNA girasa son GyrA, una proteína de 97-kDa codificada por el gen *gyrA*, y GyrB, una proteína de 90-kDa codificada por el gen *gyrB*. Las subunidades de la topoisomerasa IV son ParC (75 kDa) y ParE (70 kDa). Estas 2 enzimas actúan juntas en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA. Las quinolonas se unen a la subunidad GyrA formando un complejo que bloquea la funcionalidad de la enzima (Jacoby, 2005, Maxwell, 1992). Algunas bacterias son capaces de vivir solo con la DNA girasa, pero la mayoría poseen ambas enzimas. En las bacterias Gram-negativas, la girasa es más susceptible de ser inhibida por las quinolonas que la topoisomerasa IV, mientras que en las Gram-positivas la topoisomerasa IV es normalmente la primera diana, y la girasa es intrínsecamente menos susceptible (Jacoby, 2005).

Los principales mecanismos de resistencia a las quinolonas son mutaciones en las regiones determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), del gen *gyrA*, en el caso de las bacterias Gram-negativas, o de *parC*, en Gram-positivas. Las sustituciones de aminoácidos en las QRDR de GyrA o ParC están localizadas dentro del centro de unión al DNA, en la superficie de estas enzimas (Jacoby, 2005). A parte de estas mutaciones, se han descrito otros mecanismos de resistencia a quinolonas como la reducción de la acumulación intracelular del antimicrobiano (por disminución de la permeabilidad de la membrana externa o por aumento de la actividad de eflujo) y la protección de las dianas mediante proteínas Qnr. Estos genes *qnr* son transportados por plásmidos, confieren un nivel bajo de resistencia a fluoroquinolonas en otras especies bacterianas, pero no han sido descritos en *Campylobacter* (Payot et al., 2006).

En *Campylobacter*, hay evidencias crecientes de que la diana secundaria (topoisomerasa IV) está ausente, ya que sólo existe en la literatura una cita referente a *parC* (Gibreel et al., 1998), que no se ha corroborado mediante estudios genómicos. Tampoco han sido descritas mutaciones en *Campylobacter* en la subunidad GyrB (Alfredson y Korolik, 2007, Payot et al., 2006). La ausencia de una diana secundaria para el antimicrobiano en *Campylobacter* sugiere que solo la modificación de la subunidad GyrA es responsable de conferir un fenotipo de elevada resistencia a las fluoroquinolonas en *C.jejuni* y *C.coli* (Luangtongkum et al., 2009, Alfredson y Korolik, 2007, Payot et al., 2006, Wieczorek y Osek, 2013). La mutación de GyrA más frecuente en *C.jejuni* y *C.coli*es Thr86Ile, asociada a valores de CMI \geq 32 μ g/ml (Dionisi et al., 2004; Alonso et al., 2004; Jesse et al., 2006). Aunque muy minoritarias, también se han detectado las mutaciones Asp90Asn y Thr86Lys, que confieren valores inferiores de resistencia (8-16 μ g/ml), Thr86Ala (2 μ g/ml), Thr86Val, Asp90Tyr y las mutaciones dobles Thr86Ile-Pro104Ser y Thr86Ile-Asp90Asn (Payot et al., 2006).

Se han descrito distintos métodos para detectar estas mutaciones en la subunidad GyrA, una vez identificado la especie de *Campylobacter* de la que se trata. Algunas de estas técnicas son: MAMA-PCR (Zirnstien et al., 1999,

Zirnstein et al., 2000), PCR-RFLP (Alonso et al., 2004) y PCR en tiempo real (Dionisi et al., 2004).

1.3.2.3 Resistencia frente a tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro eficaces contra un gran número de bacterias Gram-positivas y negativas. Debido a su gran espectro de actividad y a que no son unos antimicrobianos de coste elevado, han sido usados excesivamente en la profilaxis y tratamiento de infecciones humanas y animales y también como promotores del crecimiento animal, lo que tuvo como consecuencia la masiva aparición de organismos resistentes (Chopra y Roberts, 2001, Barbosa et al., 1999).

Las tetraciclinas se unen a los cationes de Mg^{2+} para atravesar la membrana externa de las bacterias y luego, en el espacio periplásmico, se disocian y difunden pasivamente hasta el citoplasma dónde se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la interacción con el RNA transferente, inhibiendo la elongación peptídica (Wieczorek y Osek, 2013).

La resistencia a tetraciclina en *Campylobacter* es conferida por el gen *tet(O)*, presente en *Campylobacter* aislados de distintos países y de diferentes especies animales. No se han encontrado otros genes de resistencia *tet* en *Campylobacter* (Luangtongkum et al., 2009). El gen *tet(O)* codifica una proteína de protección ribosomal (RPPs) llamada Tet(O). Esta proteína reconoce el sitio A en el ribosoma bacteriano y se une de tal manera que induce un cambio conformacional que produce la liberación de la molécula de tetraciclina. La competencia entre Tet(O) y tetraciclina garantiza que no puedan coexistir ambos en el complejo ribosomal (Li et al., 2013). Además este cambio conformacional persistirá durante un largo período de tiempo, lo que permitirá que la elongación proteica continúe realizándose de manera eficiente (Connell et al., 2003a, Connell et al., 2003b).

La resistencia a tetraciclina está intensamente relacionada con plásmidos conjugativos. De hecho, el primer plásmido en *C.jejuni* que se mostró que transfería resistencias mediante conjugación confería resistencia a tetraciclina mediada por *tetO* (Tenover et al., 1985). La presencia de este gen en plásmidos podría explicar su extensa distribución, aunque también hay evidencias de su localización en el cromosoma (Crespo et al., 2012, Pratt y Korolik, 2005).

1.3.2.4 Resistencia frente a aminoglicósidos

Los aminoglicósidos son antibióticos bactericidas, de amplio espectro, muy potentes y comúnmente usados en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (Vakulenko y Mobashery, 2003, Davies y Wright, 1997). Estas moléculas actúan a nivel del ribosoma, uniéndose a la subunidad 30S e interrumpiendo así el proceso de elongación de péptidos y haciendo que el ribosoma sea más propenso a producir errores en la traducción, lo que dará lugar a una síntesis anómala de proteínas (Olkola et al., 2010).

Varios han sido los mecanismos descritos en la resistencia bacteriana a los aminoglicósidos. Entre ellos se incluyen: descenso en la absorción y acumulación del antibiótico, modificación de la diana ribosomal, eflujo del antibiótico y modificación enzimática del aminoglicósido. Éste último es el principal mecanismo de resistencia encontrado en aislados clínicos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en las que los antibióticos modificados no pueden unirse al ribosoma perdiendo su efectividad bactericida (Vakulenko y Mobashery, 2003).

Las enzimas que modifican los aminoglicósidos se dividen en tres grandes grupos (Aarestrup y Engberg, 2001): aminoglicósido fosfotransferasas (APH), aminoglicósido nucleotidiltransferasas (ANT, también denominadas AAD por aminoglicósido adenililtransferasas) y aminoglicósido acetiltransferasas (AAC), habiendo sido detectadas enzimas de los tres grupos en *Campylobacter*. El gen *ant(6)*, también denominado *aadE* que confiere resistencia a la estreptomicina, ha sido identificado con frecuencia en *Campylobacter* y parece proceder de bacterias Gram-positivas (Abril et al.,

2010). Perteneciendo a una familia génica diferente, el gen *ant(3'')*, también denominado *aadA* y que confiere resistencia simultánea a espectinomicina y estreptomicina, procedería de enterobacterias y ha sido identificado en casos puntuales en *Campylobacter* (O'Halloran et al., 2004). Por otra parte, también se han detectado en *Campylobacter* genes de la familia *aph(3')*, que confieren resistencia a kanamicina, neomicina y, en algunas variantes, a gentamicina (Shaw et al., 1993), así como el gen *aacA4*, que confiere resistencia a gentamicina y tobramicina (Lee et al., 2002). En algunos casos se han observado agrupación de genes (clúster) de resistencia a los aminoglicósidos, como *aadE-sat4-aphA-3*, de localización tanto plasmídica como cromosómica (Qin et al., 2012).

Además se ha relacionado la resistencia a estreptomicina con mutaciones en el gen *rpsL*, que codifica la proteína ribosomal S12 ó RpsL. Se ha detectado la mutación AAA→AGA (K→R) en el codón 43 y las mutaciones AAA→AGA (K→R), AAA→GAA (K→E) y AAA→CAA (K→Q) en el codón 88. Estas mutaciones aparecen en valores altos de resistencia a estreptomicina (CMI >1024 µg/ml) y siempre ocurren en el codón 43 o en el 88, pero nunca en ambos sitios simultáneamente (Olkola et al., 2010).

1.3.2.5 Resistencia frente a macrólidos

Los macrólidos son agentes antimicrobianos ampliamente usados y considerados como unas drogas seguras y efectivas. Su espectro antimicrobiano cubre la mayoría de los microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, incluyendo *Campylobacter* (Wieczorek y Osek, 2013).

Los macrólidos interrumpen la síntesis proteica en el ribosoma bacteriano, ya que se unen a la subunidad 50S y provocan un cambio conformacional que produce la terminación prematura de la elongación de la cadena polipeptídica (Poehlsgaard y Douthwaite, 2005). El principal mecanismo de resistencia frente a macrólidos en *Campylobacter*, como en otras bacterias, es la mutación del gen rRNA 23S, que está triplicado en el cromosoma de *Campylobacter*. En las cepas resistentes a la eritromicina, generalmente todas las copias tienen mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos, aunque puede coexistir un alelo silvestre y dos copias mutantes (Wieczorek y Osek,

2013, Alfredson y Korolik, 2007). La mutación más comúnmente detectada en *C. jejuni* y *C. coli* es la que ocurre en el nucleótido 2075 del dominio V del gen rRNA 23S, que también aparece en otras especies como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y otros. Otra mutación menos frecuente es la del nucleótido 2074 del dominio V. También se han descrito mutaciones en los genes *rpld* y *rplV*, estos genes codifican las proteínas ribosomales L4 y L22 y podrían estar asociadas con niveles bajos de resistencia a macrólidos (Perez-Boto et al., 2010).

La activación de bombas de eflujo es otro mecanismo de resistencia a macrólidos en *Campylobacter*, donde han sido identificados al menos 8 sistemas de eflujo diferentes. Uno de ellos es la bomba de eflujo CmeABC que trabaja de forma sinérgica con las mutaciones, e incluso en ausencia de cualquier otro factor de resistencia. Se han encontrado cepas muy resistentes de *Campylobacter* con mutaciones en las posiciones 2074 o 2075 del rRNA 23S en las que, tras la inactivación de CmeABC, se redujo significativamente el nivel de resistencia a eritromicina de 2 a 4 veces (Wieczorek y Osek, 2013).

2.Objetivos.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo serán:

1. Recoger e identificar un conjunto de unas 150 cepas de *Campylobacter* (fundamentalmente *C.jejuni* y *C.coli*), procedentes de casos clínicos humanos, aisladas en hospitales de Cáceres, Navalmoral de la Mata y Salamanca; de alimentos destinados al consumo humano; así como de muestreos o casos clínicos de animales de las unidades de enfermedades infecciosas de las Universidades de Córdoba y Complutense de Madrid.
2. Determinar la sensibilidad de estas cepas frente a los antimicrobianos de uso clínico recomendados en la terapia de estos microorganismos, además de los más habitualmente utilizados en sanidad y producción animal como medida terapéutica y/o profiláctica.
3. Identificar la presencia de mutaciones en el gen *gyrA*.
4. Identificar la presencia de los genes *aad*, y *tetO*, y valorar su potencial de transmisión.

3.Material y Métodos.

3.1 Material biológico

El material biológico empleado en el presente trabajo fue aislado por los servicios de Microbiología de los Hospitales de Cáceres (Hospital San Pedro de Alcántara, 85 aislados), Salamanca (Hospital Universitario, 47 aislados) y Navalморal de la Mata (Hospital Campo Arañuelo, 9 aislados), correspondiendo a muestras aisladas de casos clínicos humanos que cursaron en los respectivos centros entre 2010 y 2012 (Tabla 2).

3.1.1 Medio de aislamiento

El medio de aislamiento utilizado fue el CCDA (Base de Agar *Campylobacter* Exento de Sangre) de Conda®, tras haberle sido añadido el correspondiente suplemento. Se incubó a 42°C durante 48 h en una jarra de anaerobiosis de 1l a la que se introducía un sobre de microaerofilia Campygen (OXOID®). Una vez se obtenían las primeras colonias en el medio selectivo, se realizaba un pase a Agar Sangre (OXOID®) con el fin de observar la morfología en este medio, a partir del cual se llevaría a cabo la crioconservación.

3.1.2 Medio de crioconservación

Tras obtener un cultivo puro en Agar Sangre a partir de una colonia aislada en el medio selectivo, se procedía a la recogida de todo el inóculo de la placa con un asa de siembra estéril que se introducía en un eppendorf con 1 ml de Caldo Brucella (Conda®) y Glicerol al 15%. A continuación se congelaba a -70°C. Con el objetivo de aumentar la seguridad de la colección; se llevaron a cabo dos crioconservaciones paralelas en sendos ultracongeladores con distintos sistemas de alimentación eléctrica.

3.1.3 Medio de enriquecimiento

El medio utilizado fue el Caldo Bolton (Oxoid®).

3.1.4 Medio de transporte

Se empleó un hisopo sumergido en medio AMIES W/CH.

3.1.5 Identificación de las cepas

La identificación del cepario se llevó a cabo por un Espectrómetro de masas MALDI-TOF (VITEK, MS, Biomériux®) usando como cepa control *E.coli* ATCC 8739. Para la identificación se precisó una colonia de la cepa a determinar, crecida en cultivo puro y fresco (24 h) en medio Agar Sangre.

3.1.6 Estudio fenotípico de la sensibilidad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración de un agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible de un microorganismo en un test de susceptibilidad en una dilución en agar o en caldo (NCCLS, 2008). Se trata del método aceptado y estandarizado por el “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST).

3.1.6.1 El método de la microdilución en agar

Para la preparación de los medios se usó Medio Mueller-Hinton Agar (Oxoid®) suplementado con un 5% de sangre desfibrinada de oveja (Oxoid®), al que se añadían las diluciones de antibióticos. Los antimicrobianos utilizados y los disolventes empleados en su disolución (agua, si no se indica nada), fueron: ciprofloxacina (ApplyChem®), medio volumen de agua, un volumen de HCl 1 M y agua para llevar al volumen final; eritromicina (Syva®), etanol al 95%; estreptomicina (ApplyChem®), gentamicina (ApplyChem®) y tetraciclina (Syva®).

La cantidad de antimicrobiano necesaria para elaborar la solución madre, a partir de la cual se harían diluciones seriadas para el ensayo, se calcula a partir de la fórmula: $m = V \cdot \rho / P$. Donde m es la masa del agente expresada en gramos (g), ρ es la concentración de la primera disolución (mg/l), P es la potencia del agente antimicrobiano (mg/g) y V es el volumen del diluyente (l).

La concentración de la primera disolución fue de 102.400 mg/l usando los disolventes especificados por el fabricante. Posteriormente y a partir de ésta, se obtuvieron las 4 diluciones madre, utilizando agua como diluyente, a partir de las cuales se conseguirían las diluciones finales de antibiótico para añadir al medio, cuyas concentraciones finales fueron, para todos los antibióticos (en

µg/ml): 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512. Para ello se preparaba un volumen final de 1.5 litros de medio por cada antibiótico a testar, 100 mililitros por dilución. En primer lugar, se pesa el Mueller-Hinton Agar que se disuelve en un matraz con 470 ml de agua destilada, que posteriormente se lleva a ebullición (para cada antibiótico se necesitan tres matraces). A continuación, una vez disuelto el medio éste se divide en matraces de 250ml, añadiendo a cada uno de ellos 94 ml de la preparación. Posteriormente se procede a autoclavar los 15 matraces durante 20 minutos a 121°C y se dejan enfriar en el baño a 50°C durante una hora. Tras atemperar el medio, se añaden a cada matraz 4ml de sangre desfibrinada de oveja (Oxoid®) y un mililitro de la dilución de antibiótico previamente descrita para conseguir la dilución deseada y se procede a emplacar, obteniéndose unas 5 placas por dilución de cada antibiótico, en cada una de las cuales se podrán sembrar hasta 30 cepas.

3.1.6.2 Inoculación de cepas

Las cepas que son sometidas a las pruebas de sensibilidad antibiótica se siembran en placas de agar sangre a partir del cultivo congelado y se introducen en una jarra de anaerobiosis (OXOID®) con un sobre Campygen de (OXOID®), procediéndose al cultivo entre 24-28 h en una estufa a 42°C. Una vez detectado el crecimiento bacteriano, se toman unas cuantas colonias de cada cepa y se disgregan en medio Mueller-Hinton Broth (1.5ml) para proceder a la medida de la DO_{625nm} , y a continuación esta medida se ajusta a 0.5 U de Mc Farland ($DO_{625nm} = 0.08-0.1$), obteniéndose una concentración celular de $1-2 \cdot 10^8$ UFC/ml. Con estos inóculos se procede a la siembra en los medios con las distintas diluciones de antibiótico, tras dividir cada placa de petri en unos 30 cuadrantes e inoculando 2µl de cada cepa. Finalmente, las placas se introducen en una jarra de microaerofilia con el sobre correspondiente y se incuban en una estufa de 42 °C durante 24 h. Como control de calidad, cada placa incluye siempre la cepa control *Campylobacter jejuni* ATCC® 33560, determinándose la CMI como la concentración más baja de antimicrobiano a la que no observamos crecimiento bacteriano visible.

3.1.7 Conjugación de *Campylobacter*

Se sembraron 20 μ l de las cepas (donadoras y receptoras) individualmente en placas de Agar Sangre a 42°C 48 h. A continuación se pasó una colonia de cada cepa a dos placas de Mueller-Hinton Agar con antibiótico (estreptomycin y eritromicina en unos casos o tetraciclina y ciprofloxacina en otros) para realizar los controles negativos. Tras incubar 24 h a 42°C y comprobar que los crecimientos son los esperados, se toma una colonia de la placa de Mueller-Hinton con el antibiótico determinado y se inocula en una placa de Mueller-Hinton suplementado con sangre (5%) 24 h a 42°C. A continuación se disgregan las células en Mueller-Hinton Broth y se llevan a una OD₅₅₀ de 0.5, se mezclan 100 μ l cada de las cepas receptora y donadora y se añaden sobre un filtro de nitrocelulosa (0,45 μ m) en una placa de Mueller-Hinton suplementado con sangre (5%) incubándose durante 5-6 h a 42°C. Además de la mezcla de conjugación, se realiza el mismo protocolo con 100 μ l de cada cepa parental, individualmente, como controles negativos de la conjugación. Finalmente se introducen los filtros en 500 μ l de Mueller Hinton Broth, sembrándose distintas diluciones, por triplicado, en Mueller-Hinton suplementado con sangre (5%) conteniendo doble selección. Paralelamente se hace un recuento de viables, sembrando 100 μ l de la mezcla de conjugación y de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} en medio selectivo, para calcular la eficiencia de conjugación. Todas las siembras se hacen por triplicado y se cultivan 48 h a 42°C.

3.1.8 Transformación

Este protocolo, que se lleva a cabo en esterilidad, se utilizó para transformaciones de la cepa XL1 blue MRF' de *Escherichia coli*. Se partió de un preinóculo de 50ml de medio LB en el que se crece, toda una noche, la cepa elegida en presencia de antibiótico de selección a la concentración necesaria. Se añaden 25 ml del preinóculo a dos erlenmeyer de 2 L con 1 L de medio LB fresco cada uno. Se mide la DO_{600nm} e incubamos a 30 °C ó 37 °C, dependiendo de la especie bacteriana, en incubador orbital con fuerte agitación (aprox. 300 rpm). Se mide cada 20 o 30 minutos la DO_{600nm}. Cuando la densidad óptica alcanzada se encuentra próxima a 0,4 se retiran las células a un baño de agua helada donde se mantienen de 15 a 30 minutos agitando

frecuentemente para que el cultivo permanezca a una temperatura homogénea. Se centrifugan las células a 1000 x g en tubos previamente enfriados durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante y el sedimento de células se resuspende en 500 ml de agua ultra pura enfriada con anterioridad. Se vuelven a centrifugar a la misma velocidad esta vez durante 20 min. Se lleva a cabo un segundo lavado de la pella en este caso con 250 ml glicerol al 10 %, también enfriado sobre los 4 °C. Se tuvo extremo cuidado al decantar el sobrenadante para no desprender las células ya que el glicerol hace que pierdan adherencia. Tras una nueva centrifugación, se realiza un último lavado también con glicerol, pero únicamente con 10 ml. Se centrifuga en las mismas condiciones. La masa de células resultante se disgrega en 1 ml de medio GYT (glicerol, 10%; extracto de levadura, 0,125%; triptona, 0,25%), evitando, en todo lo posible, pipeteos continuados o el uso del vórtex que pueda dañar las células. Se mide la densidad óptica a 600nm de una dilución 1:1000 de la suspensión de células para determinar su concentración. Se tiene en cuenta que una absorbancia de 1.0 supone aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células/ml. Se diluyen las células con medio GYT hasta una concentración de 2×10^{10} a 3×10^{10} células/ml. En esas condiciones la conductancia de la suspensión celular ha de ser menor de 5 mEq. Se divide en alícuotas de 100ul y se conservan a -80°C hasta su electroporación.

Las células se conservan a -80°C en el medio GYT que posee un alto contenido en glicerol y una baja conductividad eléctrica para tratar de evitar la creación de arcos eléctricos en el momento de la electroporación.

La electroporación se realizó en condiciones estériles. Se mantienen en hielo las cubetas de electroporación (servidas por BioRad). Las condiciones de electroporación son de 25 µF de capacitancia, 2,5 kV con una resistencia de 200 ohm, que se fijan en el generador de pulsos (BioRad; ver sección de aparataje). Se colocan 45 µl de suspensión de células electrocompetentes conservadas a -80°C en la parte superior de la cubeta. Se añade, en el interior de la gota de células, entre 10 pg y 25 ng del DNA a introducir en la bacteria. Con un suave golpe se hace caer la mezcla al fondo de la cubeta que se tapa inmediatamente. Se seca rápidamente la condensación exterior de la cubeta y se coloca en el dispositivo de electroporación suministrándole el pulso eléctrico.

La constante temporal tras pulso ha de registrarse entre 4 y 5 milisegundos con una intensidad de campo eléctrico de 12,5 kV/cm. Tras electroporar se añaden 955 µl de medio LB a temperatura ambiente. Las células son transferidas a un tubo falcon de 15 ml donde se incuban en agitación por una hora para permitir la expresión de los genes marcadores que transporta el DNA introducido. Una vez transcurrido el tiempo se plaquean entre 100 y 200 µl de suspensión celular en LB-agar con el antibiótico de selección correspondiente. Tras dejar unos minutos para permitir que el medio líquido sea absorbido por el agar, se dejan incubando a la temperatura adecuada el tiempo necesario a la espera de que aparezcan colonias.

3.1.9 Extracción de DNA genómico

Se disgregó una colonia de una placa de Agar Sangre en 500µl de Tris-HCl 10 mM y pH 8,0. A continuación se centrifuga a 10000 x g durante 5 min, se elimina el sobrenadante y se disgrega el precipitado celular en 1 ml de Tris-HCl 10 mM y pH 8,0, incubándose a 100°C durante 5 min. Después de centrifugar a 10000 x g durante 5 min, se recupera el sobrenadante, que se utilizará como fuente de DNA y se almacena a -20°C.

3.1.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un método de síntesis de ácidos nucleicos “in vitro” mediante el cual un segmento particular de ADN puede ser replicado de forma específica. El procedimiento involucra un equipo, el termociclador, y una serie de productos que se enumeran a continuación:

- Dos cebadores, u oligonucleótidos, o secuencias cortas “cebadoras” de DNA que flanquean el fragmento de DNA que va a ser amplificado. En el caso de la PCR múltiple se añaden tantas parejas de oligos como se deseen.
- DNA a amplificar, que debe desnaturalizarse por calor para separar las hebras y ser “copiado”. La temperatura que se requiere para ello suele ser próxima a los 90°C.
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), a partir de los cuales se sintetizará el nuevo DNA, y que se utilizan a una concentración final de 0,2 mM.

- La polimerasa (acompañada de su buffer) que será la encargada de sintetizar el DNA. En este trabajo se empleó la Taq polimerasa de la empresa Biotools, con el tampón y las condiciones indicadas por el fabricante.
- El ión Mg^{2+} libre en el medio, proporcionado en forma de $MgCl_2$, cuya concentración es un factor crítico en la reacción de PCR. En este trabajo se utilizó siempre una concentración final en la PCR de 1,5 mM de Mg^{2+} .
- Otros componentes de la reacción PCR a tener en cuenta son: el pH, que debe ser óptimo para la enzima y la temperatura de hibridación de los ácidos nucleicos.

La secuencia general del proceso consta de tres etapas, que se repiten 30 veces:

1. **Desnaturalización**: el DNA a amplificar debe desnaturalizarse por calor para separar las hebras y ser “copiado”. La temperatura que se utiliza es 94°C, que se extiende durante 1 min.

2. **Alineamiento**: Unión de los oligos a sus secuencias complementarias del DNA a amplificar, que se logra bajando la temperatura a unos 50-65°C, dependiendo de cada caso. En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo y las Ta (temperaturas de alineamiento) utilizadas. El alineamiento se realiza durante 0,5 min.

3. **Extensión**: Una vez unidos los oligos al DNA que se desea amplificar comienza la extensión desde los extremos 3' de los oligos por la polimerasa. La temperatura de incubación es de 72 °C y el tiempo es variable, 1 min por Kb, con un mínimo de 1 min.

3.1.11 Preparación de geles de agarosa y separación electroforética del DNA

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica muy empleada para la caracterización del DNA, y se ha utilizado en este trabajo reiteradas veces con diversos fines. Dependiendo del tamaño de cada fragmento que se ha separado se ha ajustado la concentración de agarosa en el rango 0,8-1.5%.

Material y Métodos

Para preparar el gel, se pesa la agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda®) y se funde por calentamiento en TBE 0,5x (BIO-RAD®) hasta obtener una disolución clara y transparente. Se deja enfriar hasta aproximadamente 50°C para añadir finalmente el Gel StarNucleic Acid Gel Stain (Lonza®) a una concentración de 0,05 µl/ml. Se vierte todo sobre una placa de electroforesis y se deja a temperatura ambiente hasta que solidifique.

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Gen | Cebadores (5'-3') | Ta | Producto | Referencia |
|---------------------------|---|----|---------------------------------------|------------------------------------|
| <i>tetO</i> | tetOF: GCGTTTTGTTTATGTGCG | 52 | 560 | Bacon et al., 2000 |
| | tetOR: ATGGACAACCCGACAGAAG | | | |
| <i>tetO</i> , <i>tetM</i> | tetDF: GCTCA(T/C) GTTGA(T/C)GCAGGAA | 50 | 1293 | Barbosa et al., 1999 |
| | tetDR: AGGATTTGGCGG(C/G)ACTTC(G/T)A | | | |
| <i>gyrA</i> | JEMAF : TTT TTA GCA AAG ATT CTG AT | 50 | 368 (WT+MUT) + 265 (MUT) | Zirnstein et al., 1999. |
| | JEMAR1: CAA AGC ATC ATA AAC TGC AA | | | |
| | JEMAR2: CAG TAT AAC GCA TCG CAG CG | | | |
| | COMAF : TAT GAG CGT TAT TAT CGG TC | 50 | 505 (WT+MU) + 192 (MUT) | Zirnstein et al., 2000 |
| | COMAR1: TAA GGC ATC GTA AAC AGC CA | | | |
| | COMAR2 : GTC CAT CTA CAA GCT CGT TA | | | |
| | gJC-F: GAGATGG(T/C)TTAAAGCCTGTTCA | 54 | 330(WT+M) + 160 (WT) + 110 (MU) | Este trabajo |
| | gJC-R: TGGAA(C/T)AAAATC(T/G)ACCGTATCT | | | |
| | sWT-F: GgTATCA(C/T)CCACATGG(A/C)GATtc | | | |
| | sMU-R : AC(T/C)AA(A/G)GCATC(G/A)TAAAC(T/A)GCca | | | |
| <i>rpsL</i> | RPSLF: CCAGCGCTTAAAAATTGTCC | 55 | 247 | Oikkola et al., 2010 |
| | RPSLR: TATCAAGAGCACCACGAACG | | | |
| <i>Int1</i> | Int1F: GCTCTCGGGTAACATCAAGG | 54 | 242 | Leverstein-Van Hall et al. 2002 |
| | Int1R: TCAGGAGATCGGAAGACCTC | | | |
| <i>Int1-GC</i> | 5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3' | 56 | Variable | Levesque et al. 1995 |
| | 5'-AAA AGC AGA CTT GAC CTG A-3' | | | |
| <i>ant(6)-Ia</i> | SAF: -GATTGT(T/C)CG(T/C)CATGAGCTGCT | 56 | 327 | Este trabajo |
| | SAR: -GTGCTATCCAGGCAGCCGGTT | | | |
| <i>ant(6)-Ib</i> | SBF: TGCAAAA(G/A)CC(G/C)GA(A/G)GATATGG | 57 | 305 | |
| | SBR: TTCCTT(G/T)CG(G/A)CATAA(G/T)CC(C/T)TT | | | |
| <i>ant(6)-Ie</i> | SEF: -TGCCT(A/C)AAATTGG(G/A)T(G/A)AGTT | 52 | 368 | |
| | SER: ACCTAGCCA(A/G)ATTTCAAA(A/G)CCAAA | | | |
| | STREJ-F: TGCAAAGCGAAAAAGAAT | 49 | 878 | |
| | STREJ-R: TTATAATTTTCTTAAATTTTGCAAT | | | |
| | STREC-F: TGCAAAATCAAGATAAATTTTAAAAC | 51 | 899 | |
| | STREC-R: TTACAATTTTCTTAAATTTTACAAT | | | |
| | STRC-F:GTATGCGCAAAAATGATTAAAG | 50 | 1110 | |
| | STRC-R: AAGGAAAAATTTAAATATTGGTTTCA | | | |

El gel se introduce en una cubeta de electroforesis (BIORAD®) que contiene TBE 0,5x (Lonza®). Se cargan los geles con 8 µl del producto de PCR junto con 2 µl de tampón de carga (DNA Loading Buffer 6x, Lonza®). Como marcador de peso molecular se utilizó el Simply Load 100bp DNA Ladder (Lonza®) para bandas de tamaño pequeño y el 1 Kb DNA Ladder Plus (Favorgen®) para fragmentos mayores. Se aplicaron voltajes entre 50-80V y la

visualización de los geles se hizo con un transluminador con el software incorporado (GeneSnap, Syngene®).

3.1.12 Clonación de fragmentos de PCR

Se empleó el sistema pGEM-T Easy Vector (Promega®) el cual incluye los componentes de reacción necesarios para producir los plásmidos recombinantes. El vector de clonación empleado en este trabajo fue pGem-T Easy. En él se clonaron productos purificados obtenidos a partir de reacciones PCR, generándose así un plásmido recombinante para su posterior amplificación y análisis en *E.coli*.

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl y se prolongó 1 hora a 30° C. En la mezcla de reacción se incluyó 5 µl de Buffer de ligación (2x), 1 µl de vector pGem-T Easy, 1 µl de enzima ligasa, 1µl de producto purificado PCR y 2 µl de agua. Los resultados de la ligación se sometieron a electroporación según lo descrito en el apartado 3.1.8 de esta sección.

3.1.13 Purificación de Productos de PCR

Se empleó el sistema comercial “SpeedTools PCRClean-UpKit®”, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biotools). El DNA se purificó desde geles de agarosa o bien, cuando era lo suficientemente homogéneo, directamente desde las reacciones de PCR.

3.1.14 Secuenciación y análisis de resultados

La secuenciación de los productos de PCR se realizó en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB), de la Universidad de Extremadura. Los resultados se analizaron mediante las herramientas bioinformáticas disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), SMS (<http://www.bioinformatics.org/sms/>) y en EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>).

4. Resultados I. Análisis Microbiológico y fenotípico de los aislados de *Campylobacter*

4.1 Origen e identificación de los aislados bacterianos

Las 141 cepas de *Campylobacter* que componen la colección analizada en este trabajo (tabla 2) proceden de los siguientes Hospitales: San Pedro de Alcántara, Cáceres (85 cepas); Universitario de Salamanca, Salamanca (47 cepas) y Campo Arañuelo, Navalmoral de la Mata, Cáceres (9 cepas). La identificación de las cepas se realizó mediante MALDI-TOF, detallado en el capítulo de Materiales y Métodos, pudiéndose determinar la presencia en la colección de 134 cepas de *C. jejuni* y 7 cepas de *C. coli*.

4.2 Resistencia frente a los antimicrobianos

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los agentes antimicrobianos eritromicina (ERI), ciprofloxacina (CIP), estreptomicina (EST), tetraciclina (TET) y gentamicina (GEN) se determinaron mediante el método de dilución en agar, detallado en el capítulo de Materiales y Métodos, y se muestran en la tabla 2.

El límite utilizado para definir la resistencia o sensibilidad de las cepas de la colección frente a los antimicrobianos ensayados en este trabajo corresponde al ECOFF o punto de corte epidemiológico definido por EUCAST (www.eucast.org) a partir de la distribución de valores de CMI observados para los aislados en la naturaleza de estas bacterias. Algunas de las cepas analizadas presentan valores de CMI solo ligeramente superiores a su valor de ECOFF (lo que corresponde a un factor ½ en la serie de diluciones en agar del antimicrobiano), lo que se ha considerado como una resistencia intermedia (tabla 2).

Resultados

Tabla 2: Caracterización microbiológica y fenotípica del cepario de *Campylobacter*.

| Nombre ¹ | Especie | CMI ^{2,3,4} | | | | |
|---------------------|------------------|----------------------|------|-----|------|-----|
| | | ERI | CIP | EST | TET | GEN |
| HCC1 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 32 | 1 |
| HCC2 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 128 | 128 | 2 |
| HCC3 | <i>C. jejuni</i> | 0.25 | 32 | 2 | 128 | 1 |
| HCC4 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 32 | >512 | 16 |
| HCC5 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 4 | 256 | 1 |
| HCC6 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC7 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 2 |
| HCC8 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 64 | 1 |
| HCC9 | <i>C. jejuni</i> | 0.125 | 8 | 2 | 64 | 0.5 |
| HCC10 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 2 | 2 | 2 |
| HCC11 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC13 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC14 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 2 |
| HCC15 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 128 | 2 | 256 | 1 |
| HCC16 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 4 | 2 |
| HCC17 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.25 | 2 | 128 | 2 |
| HCC18 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 4 | 4 | 2 |
| HCC19 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 1 |
| HCC20 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 512 | 4 | >512 | 2 |
| HCC21 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 64 | 2 |
| HCC22 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC23 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 512 | 4 | >512 | 2 |
| HCC24 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 2 |
| HCC25 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC26 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 1 | 8 | 4 | 2 |
| HCC27 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 1 | 8 | 2 | 4 |
| HCC28 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.25 | 4 | 4 | 2 |
| HCC29 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 256 | 2 |
| HCC30 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 8 | 512 | 2 |
| HCC31 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.5 | 4 | 2 | 2 |
| HCC32 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 128 | 8 | 8 | 2 |
| HCC33 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC34 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 2 | 8 | 8 | 2 |
| HCC35 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.25 | 2 | 4 | 2 |
| HCC36 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 4 | 4 | 2 |
| HCC37 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 2 | 512 | 2 |
| HCC38 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 16 | 2 | 64 | 1 |

Resultados

| HCC40 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 8 | 128 | 1 |
|---------------------|------------------|----------------------|------|-----|------|-----|
| Nombre ¹ | Especie | CMI ^{2,3,4} | | | | |
| | | ERI | CIP | EST | TET | GEN |
| HCC41 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 4 | 64 | 2 |
| HCC43 | <i>C. coli</i> | 8 | 256 | 4 | 512 | 2 |
| HCC44 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 2 | 2 |
| HCC45 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 4 | 128 | 2 |
| HCC46 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 16 | 1 |
| HCC47 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 2 | 128 | 2 |
| HCC48 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 4 | 512 | 2 |
| HCC49 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 4 | 128 | 2 |
| HCC50 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 512 | 2 |
| HCC51 | <i>C. jejuni</i> | 4 | 512 | 4 | >512 | 2 |
| HCC52 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 32 | 2 | 128 | 2 |
| HCC54 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 1 | 4 | 128 | 2 |
| HCC55 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 512 | 2 |
| HCC56 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 64 | 256 | >512 | 2 |
| HCC57 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 4 | 2 | 2 |
| HCC58 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 4 | 128 | 2 |
| HCC59 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 512 | 2 |
| HCC60 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 512 | 2 |
| HCC61 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 1 | 16 | 2 |
| HCC62 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 64 | 4 | 4 | 2 |
| HCC63 | <i>C. jejuni</i> | 4 | 512 | 4 | 512 | 2 |
| HCC64 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 1 | 2 | 128 | 2 |
| HCC65 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 1 | 1 | 256 | 1 |
| HCC66 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 128 | 2 | 32 | 2 |
| HCC67 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.25 | 2 | 256 | 1 |
| HCC68 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 1 |
| HCC69 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 4 | 4 | 2 |
| HCC70 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 2 | 64 | 1 |
| HCC71 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HCC72 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 2 | 128 | 2 |
| HCC73 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HCC74 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HCC75 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC76 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 1 |
| HCC77 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 512 | 2 |
| HCC81 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 2 | 128 | 1 |
| HCC82 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 4 | 128 | 1 |
| HCC83 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 2 | 128 | 1 |

Resultados

| HCC84 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 8 | 2 |
|---------------------|------------------|----------------------|-------|-----|-----|-----|
| Nombre ¹ | Especie | CMI ^{2,3,4} | | | | |
| | | ERI | CIP | EST | TET | GEN |
| HCC86 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 128 | 128 | 128 | 2 |
| HCC87 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 32 | 4 | 2 | 2 |
| HCC88 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HCC89 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HCC90 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HCC91 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 2 | 64 | 2 |
| HCC92 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HCC95 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 16 | 2 | 64 | 2 |
| HSA 1 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 4 | 64 | 2 |
| HSA 2 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 2 | 128 | 2 |
| HSA3 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 4 | 2 | 1 |
| HSA4 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 4 | 512 | 1 |
| HSA5 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 2 | 256 | 2 |
| HSA6 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 4 | 64 | 1 |
| HSA7 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 1 | 4 | 1 |
| HSA8 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 64 | 2 |
| HSA9 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 16 | 2 | 64 | 1 |
| HSA10 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 16 | 2 | 128 | 2 |
| HSA11 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 1 |
| HSA12 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 0.125 | 4 | 1 | 2 |
| HSA13 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HSA14 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.25 | 4 | 4 | 1 |
| HSA15 | <i>C. jejuni</i> | 0.25 | 0.125 | 4 | 1 | 2 |
| HSA16 | <i>C. coli</i> | 1 | 16 | 8 | 32 | 1 |
| HSA17 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 8 | 4 | 32 | 2 |
| HSA18 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 0.25 | 4 | 1 | 2 |
| HSA19 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 0.25 | 4 | 1 | 2 |
| HSA20 | <i>C. coli</i> | 1 | 16 | 4 | 64 | 1 |
| HSA21 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HSA22 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 4 | 128 | 2 |
| HSA23 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 64 | 2 | 256 | 1 |
| HSA24 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 4 | 128 | 1 |
| HSA25 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 8 | 2 | 64 | 1 |
| HSA26 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 2 | 64 | 2 |
| HSA27 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 4 | 128 | 2 |
| HSA28 | <i>C. coli</i> | 8 | 32 | 128 | 256 | 2 |
| HSA29 | <i>C. jejuni</i> | 4 | 32 | 2 | 128 | 1 |
| HSA30 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 1 | 4 | 128 | 0.5 |

Resultados

| HSA31 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 4 | 1 | 1 |
|---------------------|------------------|------|------|------|------|-----|
| Nombre ¹ | Especie | ERI | CIP | EST | TET | GEN |
| HSA32 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | >512 | 128 | 2 |
| HSA33 | <i>C. jejuni</i> | 4 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HSA35 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 4 | 128 | 2 |
| HSA36 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 2 | 256 | 1 |
| HSA37 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 4 | 128 | 2 |
| HSA38 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 4 | >512 | 2 |
| HSA39 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 32 | 2 |
| HSA40 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | >512 | 128 | 2 |
| HSA41 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 2 | 4 | 2 |
| HSA42 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 2 | 128 | 1 |
| HSA43 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 16 | 2 | 128 | 2 |
| HSA44 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 32 | 2 | 64 | 2 |
| HSA45 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 1 |
| HSA46 | <i>C. coli</i> | 2 | 0.25 | 64 | 256 | 2 |
| HSA47 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| HSA48 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 16 | 2 | 128 | 1 |
| HNA1 | <i>C. coli</i> | 0.25 | 16 | 2 | 1 | 2 |
| HNA2 | <i>C. jejuni</i> | 0.5 | 8 | 4 | 4 | 1 |
| HNA3 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 32 | 2 | 128 | 1 |
| HNA4 | <i>C. coli</i> | 2 | 2 | 32 | 256 | 2 |
| HNA5 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 0.25 | 4 | 2 | 2 |
| HNA6 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 256 | 4 | 512 | 2 |
| HNA7 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 64 | 2 | 8 | 2 |
| HNA8 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 64 | 2 | 128 | 2 |
| HNA9 | <i>C. jejuni</i> | 1 | 128 | 2 | 512 | 2 |

¹La denominación de las cepas hace referencia a su origen: HCC, Hospital S. Pedro de Alcántara (Cáceres), HSA, Hospital Universitario de Salamanca; HNA, Hospital Campo Arañuelo (Navalmoral de la Mata, Cáceres). ²Concentración mínima inhibitoria, en mg/L. ³ERI, eritromicina; CIP, ciprofloxacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; GEN, gentamicina. ⁴Valores superiores al ECOFF de cada antimicrobiano se han sombreado, en amarillo si la CMI es 2 x ECOFF y en gris si la CMI es > 2 x ECOFF. Los valores de ECOFF considerados son: ERI, 4 mg/L para *C. jejuni* y 8 mg/ml para *C. coli*; CIP, 0,5 mg/L; EST, 4 mg/L; TET, 1 mg/L en *C. jejuni*, 2 mg/L en *C. coli*; GEN, 2 mg/L; según WWW.eucast.org. La cepa *C. jejuni* ATCC 33560 se utilizó como referencia para validar la técnica.

Resultados

En términos globales, la resistencia de las cepas de *C. jejuni* frente a los antimicrobianos ensayados en este trabajo resultó corresponder a uno de los siguientes tres tipos: i) resistencia nula o prácticamente indetectable, para la eritromicina y la gentamicina; ii) resistencia intermedia, para la estreptomicina, con un porcentaje cercano al 10% de cepas resistentes; y iii) resistencia elevada, para la ciprofloxacina y la tetraciclina, con porcentajes superiores al 90% (tabla 2). De manera similar se comportaron las cepas de *C. coli*, aunque la representación de esta especie en la colección es demasiado baja como para poder considerar significativos los parámetros obtenidos (tabla 3). A pesar de ello, los porcentajes de resistencia y la distribución de valores de CMI fue muy similar para ambas especies, siendo de nuevo la eritromicina y la gentamicina los antimicrobianos más eficaces, y la ciprofloxacina y la tetraciclina los menos efectivos. La mayor diferencia se constató para la resistencia a la estreptomicina, que asciende a más de la mitad de las cepas de *C. coli*.

Tabla 3. Distribución de la resistencia frente a los antimicrobianos en *C. jejuni*

| | CMI ₅₀ ¹ | CMI ₉₀ ¹ | Rango ¹ | Resistencia ² |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------|
| ERI | 1 | 2 | 0,25-8 | 0,75 |
| CIP | 32 | 64 | 0,25-512 | 91,8 |
| EST | 32 | 512 | 1-512 | 9,0 |
| TET | 128 | 512 | 2->512 | 96,3 |
| GEN | 2 | 4 | 1-4 | 0,75 |

¹Concentraciones expresadas en mg/L. ²Para la definición de resistencia y el cálculo de su porcentaje se ha utilizado el criterio CMI > ECOFF.

Tabla 4. Distribución de la resistencia frente a los antimicrobianos en *C. coli*

| | CMI ₅₀ ¹ | CMI ₉₀ ¹ | Rango ¹ | Resistencia ² |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------|
| ERI | 2 | 8 | 0,25-8 | 0 |
| CIP | 16 | 256 | 0,25- | 85,7 |
| EST | 64 | 128 | 2-128 | 57,1 |
| TET | 256 | 512 | 1-512 | 85,7 |
| GEN | 2 | 4 | 1-2 | 0 |

^{1,2}Igual que para la tabla 3.

5. Resultados II. Análisis de los determinantes de resistencia a la tetraciclina de los aislados de *Campylobacter*

5.1 Puesta a punto de la PCR para la identificación de *tetO*

El gen *tetO*, que codifica una proteína de protección frente a la tetraciclina para el ribosoma (Li y col., 2013), ha sido identificado como responsable de la resistencia a la tetraciclina de *Campylobacter* en trabajos previos (Kurincic et al., 2012, Dasti et al., 2007, Obeng et al., 2012), aunque no existe constancia de ningún estudio exhaustivo realizado sobre aislados clínicos procedentes de humanos en España. Se decidió utilizar los cebadores *tetOF* y *tetOR*, previamente definidos (Pratt y Korolik, 2005; tabla 1, del capítulo de Materiales y Métodos), incluyendo dos bases adicionales en el cebador *tetOR*Rev para mejorar sus características

termodinámicas. La Figura 1 muestra el resultado de las amplificaciones obtenidas para cuatro cepas representativas del cepario analizado (Tabla 2, del capítulo 1 de resultados): *C. coli* sensible a la tetraciclina (HNA1), *C. coli* resistente a la tetraciclina (HCC43), *C. jejuni* sensible

a la tetraciclina (HCC57) y *C. jejuni* resistente a la tetraciclina (HSA1). Como puede observarse, en las cepas resistentes a la tetraciclina de ambas especies se produjo la amplificación de fragmentos de DNA que presentaron un tamaño compatible con el esperado, de 561 pb.

La confirmación definitiva de la identidad del fragmento obtenido en la PCR específica para el gen *tetO* se obtuvo mediante su secuenciación con los mismos cebadores *tetOF* y *tetOR* empleados para su amplificación (Figura 2).

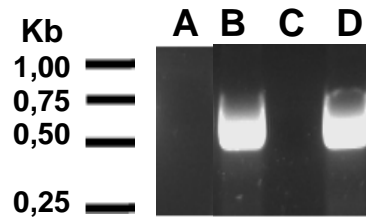


Figura 1. Detección del gen *tetO* en *Campylobacter*. A, HNA1; B, HCC43; C, HCC57; D, HSA1. Los productos de PCR se separaron en 0,5xTBE y 1% de agarosa.

Resultados

A

GGCGTTTTGTTTATGTGCGTATATATAGCGGAACATTGCATTTGAGGGATGTTATTAGAATATCTGAAAAAGAGAAAATAAAAAATCAC
AGAGATGTGTGTTCCGACAAACGGTGAATTATATCCATCCGATACAGCCTGCTCTGGTGATATTGTAATTTTACCAAATGATGTTTTG
CAGCTAAACAGTATTTTGGGGAACGAAATGCTGTTGCCGAGAGAAAATTTATTGAAAATCCTCTCCCTATGCTCCAAACAACGATTG
CAGTAAAGAAACCTGAACAGCGGGAAATATTGCTTGGGGCACTTACAGAAATTCAGATGGCGACCCTCTTTTAAATATTATGTGGA
TACTACAACGCATGAGATTATACTTTCTTTTGGGGAATGTGCAGATGGAAGTCATTTGTGCCATCCTTGAGGAAAAATATCATGTG
GAGGCAGAAATAAAGAGCCTACTGTTATATATATGAAAGACCGCTTAGAAAAGCAGAATATACCATCCACATAGAAGTCCCGCCAA
ATCCTTTCTGGGCTTCTGTCTGGGTTGTCCATAG

B

Campylobacter coli RM4661 plasmid pRM4661_48kbp, complete sequence

Sequence ID: gb|CP007182.1| Length: 47962 Number of Matches: 1

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|---|---------------|-----------|-----------|
| 1037 bits(561) | 0.0 | 561/561(100%) | 0/561(0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | <u>GGCGTTTTGTTTATGTGCGTATATATAGCGGAACATTGCATTTGAGGGATGTTATTAGAA</u> | | | 60 |
| | | | | |
| Sbjct 41855 | GGCGTTTTGTTTATGTGCGTATATATAGCGGAACATTGCATTTGAGGGATGTTATTAGAA | | | 41914 |
| ... | | | | |
| Query 541 | <u>CTTCTGTCTGGGTTGTCCATAG</u> | | | 561 |
| | | | | |
| Sbjct 42395 | CTTCTGTCTGGGTTGTCCATAG | | | 42415 |

Figura 2.A, secuencia de DNA obtenida mediante PCR con los cebadores tetOF y tetOR en la cepa HCC43. Las secuencias de los cebadores utilizadas se muestran como texto subrayado. **B**, Identificación del homólogo más cercano a la secuencia mostrada en A utilizando BLASTN sobre la base de datos NR.

La secuencia obtenida resultó ser idéntica a la correspondiente a los genes *tetO* del plásmido pRM4661 de *C. coli* (Figura 2), y también a las del plásmido pN29710-1 de *C. coli* y a la secuencia genómica de *C. jejuni* IA3902, mostrando un número variable de polimorfismos con el resto de secuencias de *tetO* presentes en bases de datos génicos (resultados no mostrados).

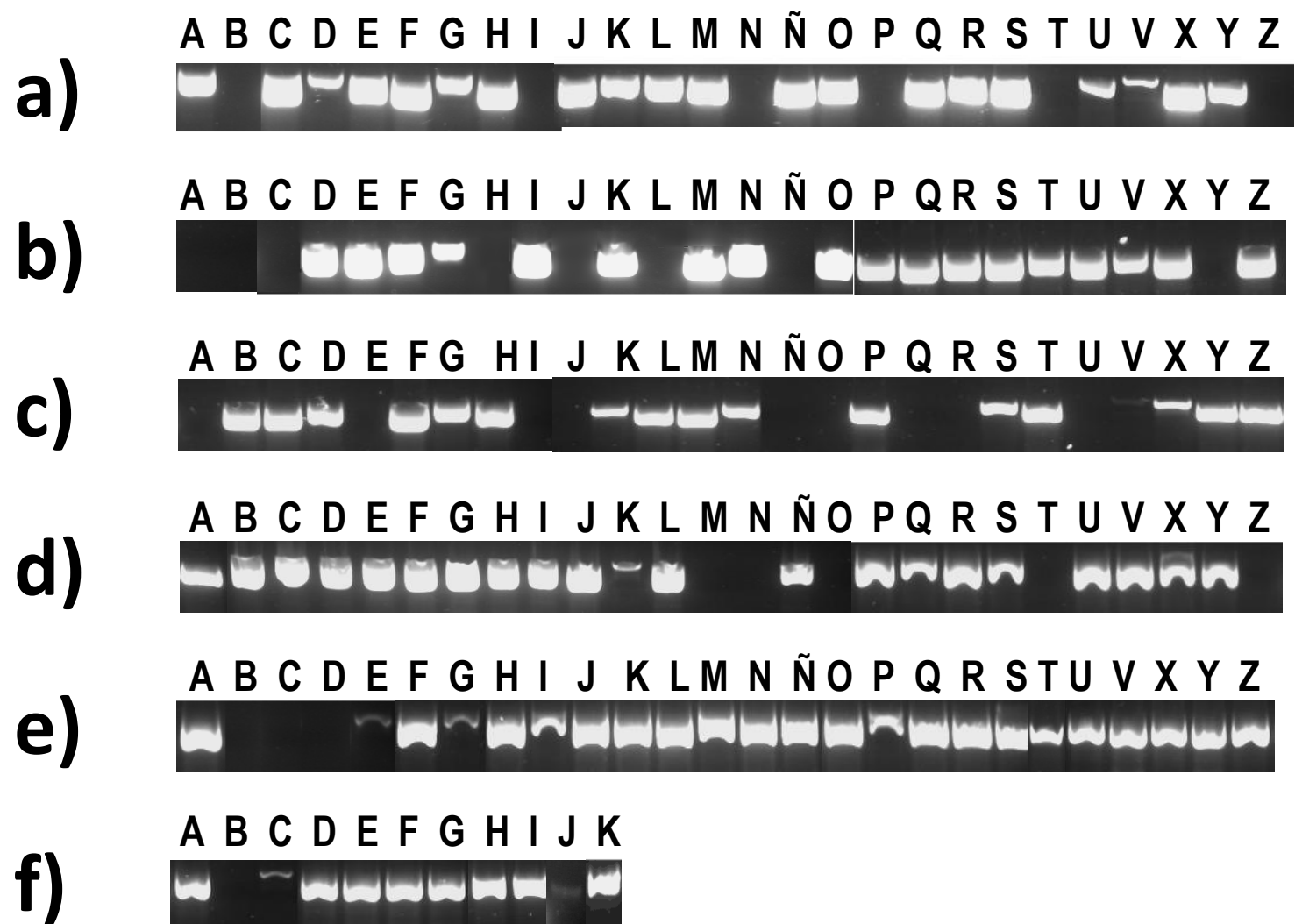
5.2 Escrutinio de *tetO* mediante cebadores específicos entre las cepas de *Campylobacter*

Una vez establecidas las condiciones para la PCR específica de *tetO* en *Campylobacter*, se procedió a su escrutinio en el cepario de aislados de origen humano (Figura 3).

Figura 3 (página siguiente). Detección de *tetQ* en las cepas de *Campylobacter*. Los productos de PCR se separaron en 0,5xTBE y 1% de agarosa. Organización de los diferentes paneles¹:

- a) A, HCC8; B, **HCC34**; C, HCC45; D, HCC14; E, HNA4; F, HSA44; G, HCC1; H, HCC3; I, **HSA41**; J, HCC77; K, HNA7; L, HNA6; M, HSA10; N, **HCC18**; Ñ, HCC4; O, HCC82; P, **HSA12**; Q, HSA21; R, HCC61; S, HCC65; T, **HNA1**; U, HCC9; V, HSA9; X, HCC63; Y, HCC15; Z, **HSA31**.
- b) A, **HSA19**; B, **HNA8**; C, **HCC62**; D, HCC64; E, HSA20; F, HCC20; G, HCC6; H, **HCC87**; I, HCC11; J, **HCC10**; K, HCC75; L, **HCC84**; M, HSA11; N, HNA3; Ñ, **HCC31**; O, HCC2; P, HCC24; Q, HCC89; R, HCC73; S, HCC72; T, HCC83; U, HCC71; V, HCC22; X, HCC43; Y, **HCC57**; Z, HSA1.
- c) A, **HCC36**; B, HCC54; C, HCC51; D, HSA45; E, **HCC44**; F, HCC86; G, HCC88; H, HCC50; I, **HCC35**; J, **HCC69**; K, HSA8; L, HSA2; M, HSA32; N, HCC49; Ñ, **HCC32**; O, **HCC28**; P, HCC23; Q, **HCC27**; R, **HCC30**; S, HCC38; T, HCC29; U, **HSA47**; V, HCC7; X, HSA5; Y, HCC17; Z, HCC 68.
- d) A, HCC70; B, HCC59; C, HSA36; D, HCC21; E, HCC55; F, HCC41; G, HCC56; H, HCC13; I, HCC 40; J, HSA48; K, HSA27; L, HCC37; M, **HSA3**; N, **HSA7**; Ñ, HSA6; O, **HCC16**; P, HSA37; Q, HSA33; R, HNA9; S, HCC74; T, **HSA18**; U, HSA29; V, HSA25; X, HCC67; Y, HCC19; Z, **HNA2**.
- e) A, HSA39; B, **HCC26**; C, **HSA15**; D, **HNA5**; E, HSA30; F, HSA46; G, HSA35; H, HCC58; I, HCC47; J, HCC60; K, HSA28; L, HCC25; M, HSA38; N, HCC52; Ñ, HSA13; O, HSA24; P, HSA22; Q, HSA16; R, HCC33; S, HCC48; T, HCC46; U, HCC90; V, HSA40; X, HCC5; Y, HSA43; Z, HCC92.
- f) A, HSA17; B, **HSA14**; C, HSA26; D, HSA23; E, HCC91; F, HCC81; G, HCC76; H, HSA42; I, HCC95; J, HCC66; K, HSA4.

¹Se señalan en verde las cepas negativas para *tetO*, presentando todas resistencia frente a la tetraciclina. La única cepa negativa para *tetO* y resistente a la tetraciclina se indica de color rojo.



Entre las 141 cepas que componen el cepario analizado en este trabajo se detectó la presencia del gen *tetO* en 109 cepas, lo que supone un 77,3% del total, un porcentaje ligeramente inferior al de resistencia a la tetraciclina calculado para este mismo conjunto de cepas (Tabla 2, del capítulo 1 de resultados).

Tabla 5. Relación entre la resistencia a la tetraciclina y la presencia del gen *tetO* entre las cepas de *Campylobacter*

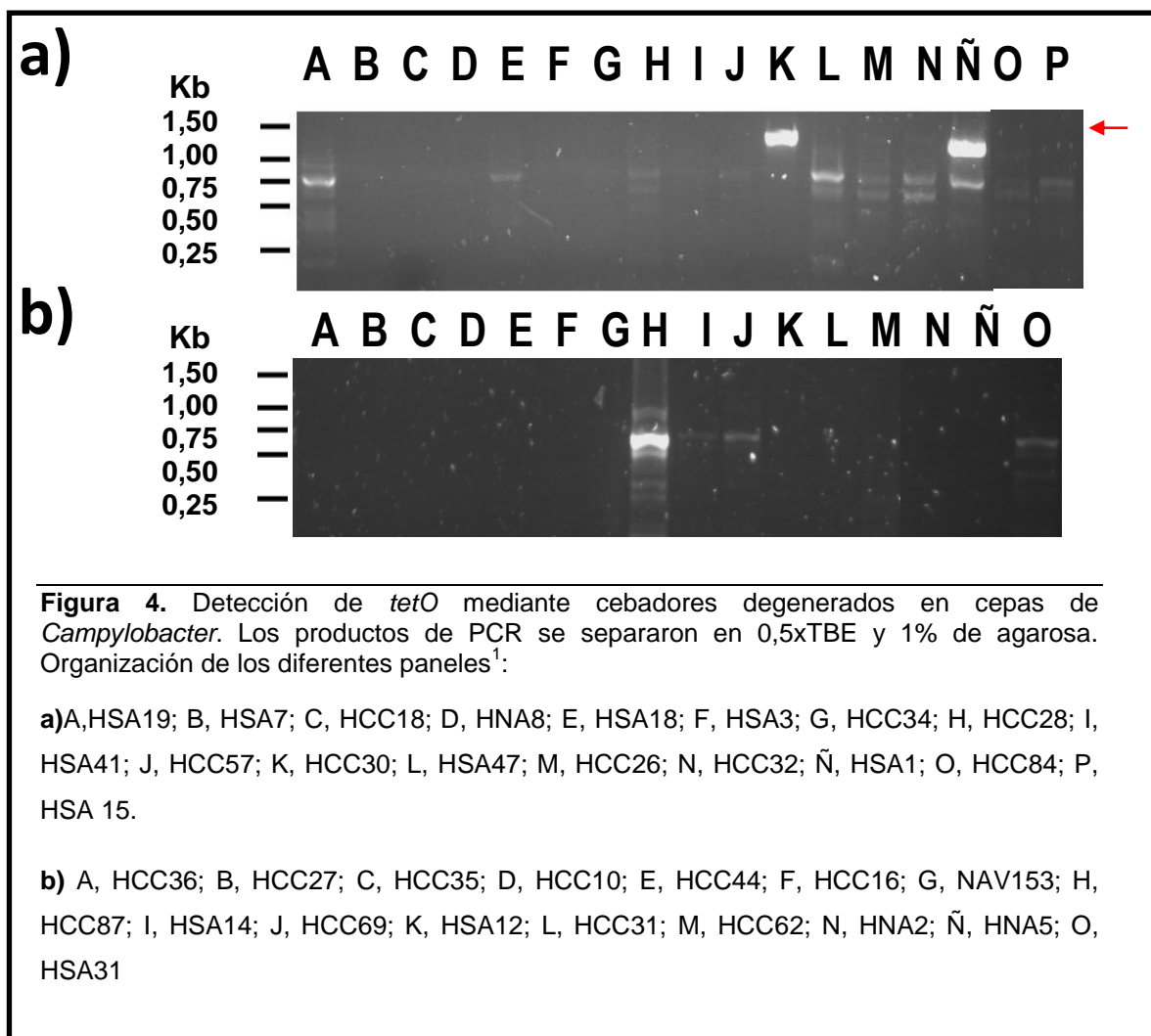
| Especie | <i>tetO</i> | ≤4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | ≥512 |
|------------------|-------------|----|---|----|----|----|-----|-----|------|
| <i>C. jejuni</i> | + | 0 | 0 | 2 | 4 | 22 | 50 | 9 | 16 |
| | - | 26 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>C. coli</i> | + | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| | - | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

La presencia del gen *tetO* está claramente relacionada con la resistencia fenotípica observada en la CMI, ya que casi todas las cepas con elevados niveles de resistencia a la tetraciclina ($CMI \geq 8 \mu\text{g/ml}$) fueron positivas a la PCR de este gen, con la única excepción de la cepa HCC30, cuya CMI es de 512 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2) y resultó negativa para *tetO* (Figura 3).

5.3 Escrutinio de genes de la familia *tet* mediante cebadores degenerados entre las cepas de *Campylobacter*

La existencia de cepas con fenotipo resistente a la tetraciclina pero negativas a la PCR específica para el gen *tetO* motivó la realización de una PCR con unos nuevos cebadores denominados tetDFy tetDR, en este caso degenerados (Tabla 1, Materiales y Métodos), que habían sido diseñados previamente sobre regiones conservadas existentes entre distintas variantes de genes *tet*, incluyendo el propio *tetO*, y utilizados para identificar nuevos miembros de la familia génica mediante la amplificación de un fragmento de 1293 pb (Barbosa y col., 1999). Todas las cepas negativas a *tetO*, además de un control positivo (cepa HSA1; Figura 3, panel B, muestra Z) se sometieron a escrutinio mediante PCR con los cebadores tetDF y tetDR (Figura 7). Los resultados obtenidos muestran que solamente se produjo un fragmento del tamaño esperado en la cepa HCC30, además del control positivo. Este

producto de PCR se aisló y se sometió a secuenciación desde sus extremos con los mismos cebadores empleados en la amplificación.



La secuencia obtenida para el fragmento amplificado en la cepa HCC30 (Figura 5) resultó ser idéntica a la del gen de resistencia a la tetraciclina existente en el plásmido pCC31 de *C. coli* y presentó un número variable de polimorfismos con otras secuencias similares.

Resultados

A

```
GTATACCAGTGGTGCAATTGCAGAACTAGGGAGCGTAGATGAAGGCACAACAAGGACAGATACAATGAATTTGGAGCGTCAAAGGGGA
ATCACTATCCAGACAGCAGTGACATCTTTTCAGTGGGAGGATGTAAAAGTCAACATTATAGATACGCCAGGCCATATGGATTTTTGG
CGGAAGTATACCGTCTTTTATCCGTATTAGACGGGAGCAGTATTATAGTTTCTGCAAAGGATGGCATAACAGGCACAGACCCGTATACT
GTTTCATGCACTACAGATAATGAAGATTCCGACAATTTTTTTCATCAATAAAATTGACCAAGAGGGGATTGATTTGCCAATGGTATAT
CGGGAAATGAAAGCAAAGCTTTCTCGGAAATTATAGTGAAGCAAAGGTTGGGCAGCATCCCCATATAAATGTAACGGACAATGACG
ATATGGAACAGTGGGATGCGGTAATTATGGGAAACGATGAAGTATTAGAGAAATATATGTCAGGGAAACCGTTTAAATGTCAGAACT
GGAACAGGAAGAAAACAGGAGATTCCAAAACGGAACGTTATTTCCCGTTTATCACGGAAGCGCTAAAAACAATCTGGGGATTCGGCAG
CTTATAGAAGTAATTGCCAGTAAATTTTATTCATCAACGCCTGAAGGTCAATCTGAAGTATGCGGGCAGGTTTTTAAGATTGAATATT
CGGAAGAAAAGACAACGCTCTTGCAATGTACGCCTTTATGGCGGAATCCTGCATTTCGGGGATTTCGGTTAGAATATCGGAAAAGGAAAA
AATAAAATTACAGAAATGTATACTTCAATAAATGGTGAATTATGTAATGATAAGGCTTATTCGGGGAAATTTGTTATTTTGCAA
AATGAGTTTTTGAAGCTAAATAGTGTCTTGGAGATACAAAGCTATTGCCACAGAGAGAGAGAATTGAAAATCCTCTCCCTATGCTCC
AAACAAGTGTGAACCGAGCAACCTCAACAAAGGGAATGTTACTTGATGCACCTTTAGAAATCTCCGACAGTGACCCGCTTCTACA
ATATTATGTGGATACACACGCATGAGATTATACTTTCTTTTTTGGGGAATGTGCAGATGGAAGTCATTTGTGCCATCCTTGAGGAA
AAATATCATGTGGAGGCAGAAATAAAGAGCCTACTGTTATATATATGGAAGACCGCTTAGAAAAGCAGAAT
```

B

Campylobacter coli plasmid pCC31, complete sequence

Sequence ID: [gb|AY394560.1](#) | Length: 44707 Number of Matches: 1

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--|-----------------|------------|-----------|
| 2248 bits(1217) | 0.0 | 1217/1217(100%) | 0/1217(0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | GTATACCAGTGGTGCAATTGCAGAACTAGGGAGCGTAGATGAAGGCACAACAAGGACAGA | 60 | | |
| | | | | |
| Sbjct 72 | GTATACCAGTGGTGCAATTGCAGAACTAGGGAGCGTAGATGAAGGCACAACAAGGACAGA | 131 | | |
| | | | | |
| | ... | | | |
| Query 1201 | GCTTAGAAAAGCAGAAT | 1217 | | |
| | | | | |
| Sbjct 1272 | GCTTAGAAAAGCAGAAT | 1288 | | |

Figura 5.A, secuencia de DNA obtenida mediante PCR con los cebadores tetDF y tetDR en la cepa HCC30. **B**, Identificación del homólogo más cercano a la secuencia mostrada en A utilizando BLASTN sobre la base de datos NR.

5.4 Análisis comparativo de las secuencias de genes tet identificados entre las cepas de Campylobacter

Las secuencias *tet* identificadas en dos de las cepas de *Campylobacter* analizadas en este trabajo son claramente distintas entre sí, aunque en ambos casos presentan homólogos frente a los que existe un 100% de identidad (Figura 6). Sin embargo, mientras que la secuencia *tet* obtenida de la cepa HCC43 presenta un 100% de identidad frente a secuencias de genes *tetO*, la secuencia procedente de la cepa HCC30 es prácticamente idéntica a las de un grupo de 4 cepas de *C. coli*, que son: pCC31 (100% de identidad), un caso clínico humano en Reino Unido (Batchelor y col., 2004); SH-CCD11C365 (1 polimorfismo en 1217 pb, 99%

de identidad) y SH-CCD11C073 (1 polimorfismo en 1217 pb, 99% de identidad), aisladas de casos clínicos humanos en China (Wang y col., 2014); y DZB4 (2 polimorfismos en 1217 pb, 99% de identidad), aislada de heces de cerdo en China (Wang y col., 2014).

Aunque sus homólogos están anotados como genes *tetO*, La secuencia *tet* obtenida de la cepa HCC30 corresponde a un gen mosaico con estructura *tetO/tetM/tetO*, como puede apreciarse de su apilamiento múltiple con un representante de las familias génicas de *tetO* y *tetM*, donde también se incluye la secuencia obtenida de la cepa HCC43 (Figura 6). La secuencia parcial del gen *tet* de la cepa HCC30 presenta una primera zona de identidad total con *tetO*, a continuación con *tetM* y finalmente de nuevo con *tetO*, a diferencia de la secuencia parcial del gen *tet* de la cepa HCC43, que es idéntica a *tetO* en toda su extensión. Esta estructura génica explica la imposibilidad de amplificar su secuencia mediante los cebadores específicos para *tetO*, lo que sí fue posible gracias a los cebadores degenerados.

Figura 6 (página siguiente). Alineamiento múltiple de las secuencias de DNA de los genes *tetM* (AM889142) y *tetO* (M18896) apilados con las secuencias de genes *tet* obtenidos de las cepas HCC30 (figura 5) y HCC43 (figura 2). Las posiciones relativas de *tetO* y *tetM* están referidas a sus codones de inicio de la traducción. Se muestran sombreadas en negro las posiciones conservadas entre *tetO* y *tetM*, en rojo las conservadas únicamente con *tetM* y en azul las conservadas con *tetO*. Los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos de los genes *tet* se muestran sombrados en amarillo (*tet* degenerados) y verde (*tetO* específicos), debajo de la secuencia de DNA.

Resultados

| | | |
|--------|--|------|
| 595M | ATGAAATTAATTAATTTGGAATTCTCTCTGTTGATGGGGAAACCTACCTTAACAGAAAGCTTATTATATACAGTGGAGCGATTTCAGAAATAGGAGCGTSGACAGAGGTACAAAGGAAAGCGATATACG | 138 |
| HCC3.0 | ----- | 67 |
| HCC4.3 | ----- | |
| 595Q | ATGAAATTAATTAATTTGGAATTCTCTCTGTTGATGGGGAAACCTACCTTAACAGAAAGCTTATTATATACAGTGGAGCGATTTCAGAAATAGGAGCGTSGACAGAGGTACAAAGGAAAGCGATATACG | 138 |
| 595M | CTTTTGAACGTCACAGAGGAATACATTCAGACGCGGATTAACCTCTTTTCAGTGGAGAAATACCTAAAGTGAACATCATAGACACGCGAGGACATATGGATTITTTTSCAGAAATATATCGTTCTTTATCGATATTA | 276 |
| HCC3.0 | ----- | 205 |
| HCC4.3 | ----- | |
| 595Q | CTTTTGAACGTCACAGAGGAATACATTCAGACGCGGATTAACCTCTTTTCAGTGGAGAAATACCTAAAGTGAACATCATAGACACGCGAGGACATATGGATTITTTTSCAGAAATATATCGTTCTTTATCGATATTA | 276 |
| 595M | GATGGGSCATTCCTACCTGATTTCTCTCAAAAGATGGCGTACAGACACACACCTCGTATATGTTTTCATGCACTTAGGAAATAGGTATTCCCAAAATCTTTTTCATCAATAAGATTGACCAAGAGGGGATTGATTTGCCA | 414 |
| HCC3.0 | ----- | 343 |
| HCC4.3 | ----- | |
| 595Q | GATGGGSCATTCCTACCTGATTTCTCTCAAAAGATGGCGTACAGACACACACCTCGTATATGTTTTCATGCACTTAGGAAATAGGTATTCCCAAAATCTTTTTCATCAATAAGATTGACCAAGAGGGGATTGATTTGCCA | 414 |
| 595M | ACGGTTTATCGAGGATTAAGAGCAAACTTTCTCTCGGAAATTGTATTCAGACAGAGGTTGCACTCATCCCTAATATGCGCTGTATGCACTTTACCGCATCTGAACATGGGATATGGTAATAGAGGAAATGATATAC | 552 |
| HCC3.0 | ----- | 481 |
| HCC4.3 | ----- | |
| 595Q | ATGGTATATCGGAAATGAAGCAAACTTTCTCTCGGAAATTGTATTCAGACAGAGGTTGCACTCATCCCTAATATGCGCTGTATGCACTTTACCGCATCTGAACATGGGATATGGTAATAGAGGAAATGATATAC | 552 |
| 595M | CTTTTGGAGAAATATACCTCTGGGAAATTTTTCAGGACATTAAGAACTGAAACAGAGGAAAGCTTAGATTTCATTAATTTTCTCTCTCTGTTTATCACGGAGTGCAGAAACCAATATAGGGATTGATTAACCTTT | 690 |
| HCC3.0 | ----- | 619 |
| HCC4.3 | ----- | |
| 595Q | CTTTTGGAGAAATATACCTCTGGGAAATTTTTCAGGACATTAAGAACTGAAACAGAGGAAAGCTTAGATTTCATTAATTTTCTCTCTCTGTTTATCACGGAGTGCAGAAACCAATATAGGGATTGATTAACCTTT | 690 |
| 595M | ATAGAGTCTATTCAGAAATTTATTCATCAACCTCTGAGGTCACTCTGAACCTTGGGAAAGTTTCAAAATTGATATTCAGAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTT | 828 |
| HCC3.0 | ----- | 757 |
| HCC4.3 | ----- | 41 |
| 595Q | ATAGAGTCTATTCAGAAATTTATTCATCAACCTCTGAGGTCACTCTGAACCTTGGGAAAGTTTCAAAATTGATATTCAGAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTTCAAAATTTT | 828 |
| 595M | TTGCGAGATCGGTTAGAAATATCGAAAAAGAAAAATAAAAAATACAGAAATGTATACCTCAATAAATGGTGAATTATGTTAAATCGATAAGGCTATTCCGGGAAATGTTTATTTTCAGAAATGATTITTTGAAG | 966 |
| HCC3.0 | ----- | 895 |
| HCC4.3 | ----- | 179 |
| 595Q | TTGCGAGATCGGTTAGAAATATCGAAAAAGAAAAATAAAAAATACAGAAATGTATACCTCAATAAATGGTGAATTATGTTAAATCGATAAGGCTATTCCGGGAAATGTTTATTTTCAGAAATGATTITTTGAAG | 966 |
| 595M | TTAAATAGTGTCTTTGGAGATACAAAGCTATTGCCACAGAGAGAGAGATTGAAAATCCCTCCCTCTGCTGCAAAACGACTGTTGAACCGACCAACCTCAACCAAGGGAATGTTACTTTGATGCACTTTTGAAGATC | 1104 |
| HCC3.0 | ----- | 1032 |
| HCC4.3 | ----- | 317 |
| 595Q | TTAAATAGTGTCTTTGGAGATACAAAGCTATTGCCACAGAGAGAGAGATTGAAAATCCCTCCCTCTGCTGCAAAACGACTGTTGAACCGACCAACCTCAACCAAGGGAATGTTACTTTGATGCACTTTTGAAGATC | 1104 |
| 595M | TCCGACAGTGAACCCCTCTCTGATATTATGTTGATCTCTGACACATGATATATACCTTTCTTTCTTGGGAAATGATCAATGGAAGTGAATTTGTCCTCTCTCTGAGAAAGTATCATGTGGAGATAGAAATAAAA | 1242 |
| HCC3.0 | ----- | 1171 |
| HCC4.3 | ----- | 455 |
| 595Q | TCCGACAGTGAACCCCTCTCTGATATTATGTTGATCTCTGACACATGATATATACCTTTCTTTCTTGGGAAATGATCAATGGAAGTGAATTTGTCCTCTCTCTGAGAAAGTATCATGTGGAGATAGAAATAAAA | 1242 |
| 595M | GAGCCTACTGTTATATATAAGAAAGACCGCTTAGAAAAAGCAAGATATCACTTCAAGTTTCCACCTCAATCTTCTGGGCTTCAATGCTCTATGCTATG | 1348 |
| HCC3.0 | ----- | 1217 |
| HCC4.3 | ----- | 561 |
| 595Q | GAGCCTACTGTTATATATAAGAAAGACCGCTTAGAAAAAGCAAGATATCACTTCAAGTTTCCACCTCAATCTTCTGGGCTTCAATGCTCTATGCTATG | 1348 |
| | TETDE ←-----→ TETDE | |

5.5 Transferencia horizontal de genes tet identificados en las cepas de *Campylobacter*

Con el fin de comprobar si los determinantes de resistencia a la tetraciclina identificados en este trabajo se pueden transferir horizontalmente se seleccionó un conjunto de cepas que, por sus características fenotípicas, fuese compatible con la selección positiva y negativa de estirpes receptoras y donadoras de conjugación, respectivamente. Así, la cepa HCC57 se utilizó como receptora de conjugación de resistencia a la tetraciclina, por su sensibilidad a este antimicrobiano y su resistencia a la ciprofloxacina. Por otro lado, considerando únicamente los fenotipos existentes, la colección de cepas de *Campylobacter* solo presenta tres candidatos como donadores de conjugación para la resistencia a la tetraciclina (sensibles a la ciprofloxacina y resistentes a la tetraciclina) que son las cepas HSA46, HCC17 y HCC67.

En los experimentos de conjugación realizados utilizando la cepa HCC57 como receptora, únicamente se obtuvo movilización de la resistencia a la tetraciclina con la cepa HSA46 actuando como donadora, ya que no se observaron colonias resistentes a ambos antimicrobianos (tetraciclina y ciprofloxacina) cuando actuaron como donadores las cepas HCC17 o HCC67. Teniendo en cuenta el número de células viables donadoras (resistentes a la tetraciclina) y el número de células con la doble resistencia presentes en la mezcla de conjugación, se obtuvo un valor de $1,53 \cdot 10^{-6} \pm 0,69 \cdot 10^{-6}$ para la eficiencia de la conjugación entre las cepas HSA46 y HCC57, correspondiendo el intervalo de confianza a la desviación típica calculada a partir del triplicado del experimento.

**6. Resultados III. Análisis de los
determinantes de resistencia a la
ciprofloxacina de los aislados de
*Campylobacter***

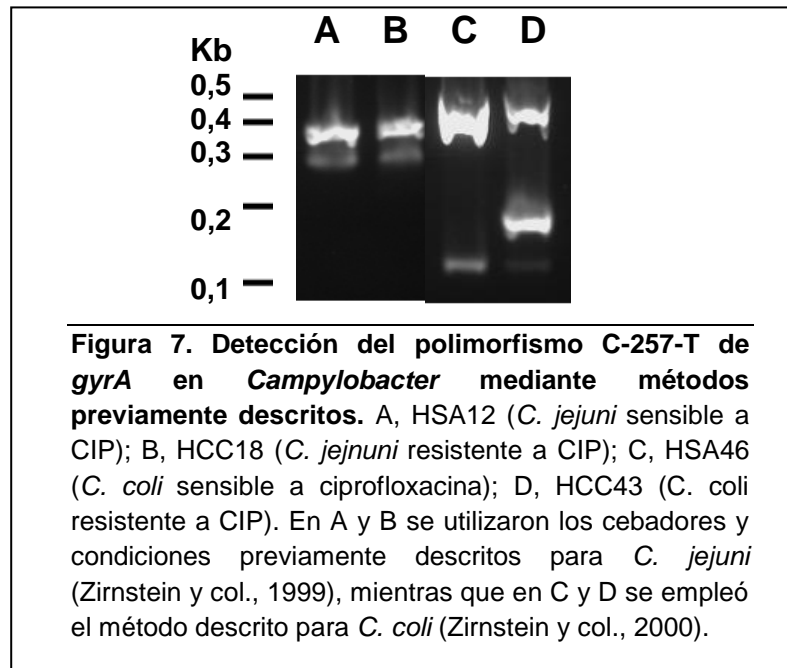
6.1 Puesta a punto de la PCR para la identificación de la mutación C-257-T de *gyrA*

La resistencia de *Campylobacter* a las quinolonas y, en particular, a la ciprofloxacina está mediada por la mutación C-257-T del gen *gyrA*, que origina la mutación T-86-I de la topoisomerasa II bacteriana, un polimorfismo común en los *Campylobacter* termofílicos de mayor interés clínico, *C. jejuni* y *C. coli*. La detección de este polimorfismo se puede realizar mediante PCR, aunque el hecho de que las secuencias de *gyrA* entre ambas especies presenten solo un 82% de identidad (Figura 8) explica que sólo se hayan descrito métodos específicos para *C. jejuni* (Zirnstein y col., 1999) y para *C. coli* (Zirnstein y col., 2000). Estos métodos emplean la tecnología denominada MAMA, acrónimo de “Mismatch Amplification Mutation Assay”, que se basa en el efecto de una segunda falta de apareamiento cercana al extremo 3' del oligonucleótido, además de la debida al propio polimorfismo que se pretende detectar, lo que provoca una pérdida significativa en la eficiencia de la PCR y posibilita su utilización como prueba específica de genotipo (Cha y col., 1992).

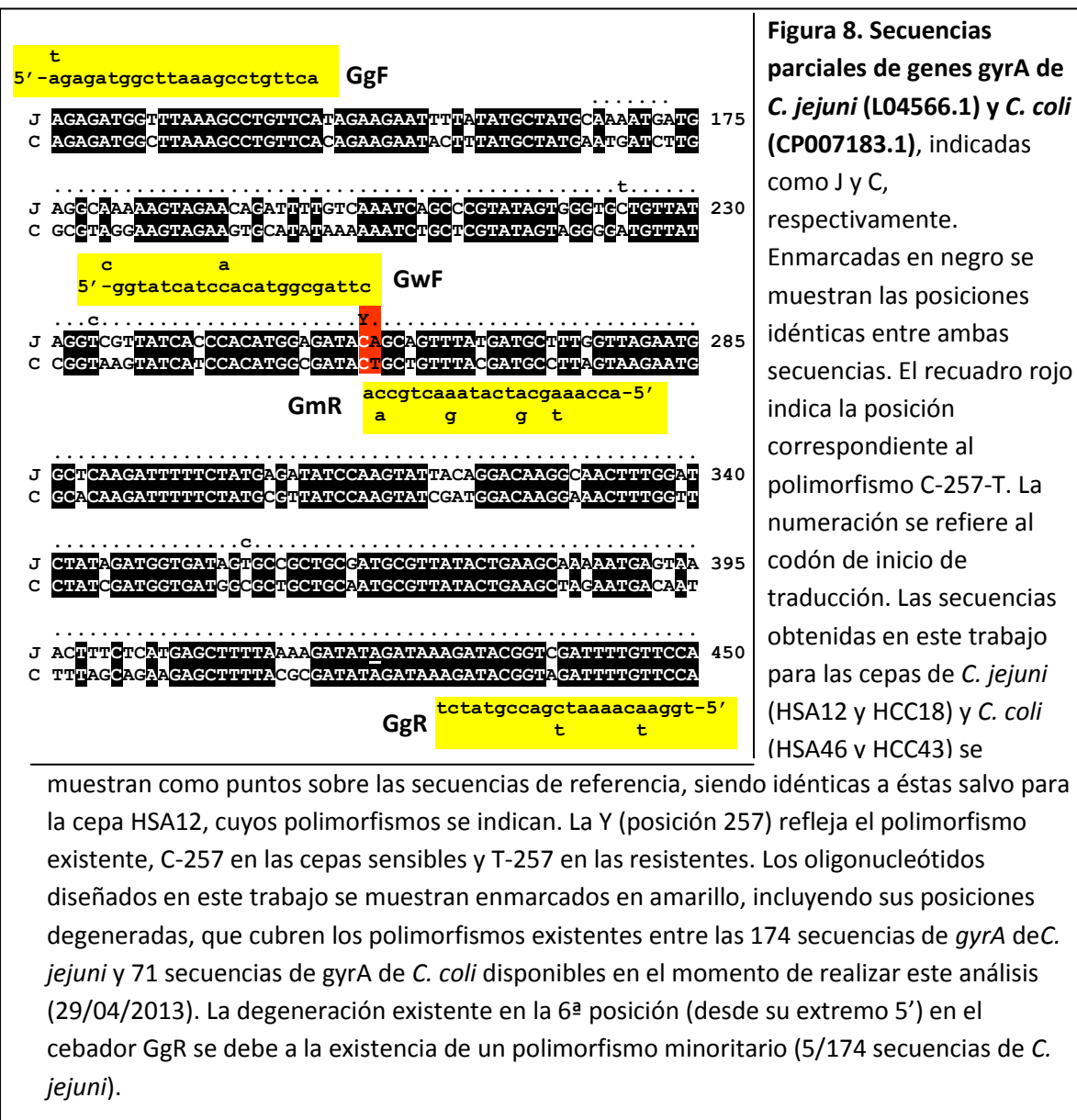
Como paso previo al análisis genotípico de los determinantes de resistencia a la ciprofloxacina existentes entre las cepas de *Campylobacter* objeto de este estudio, se seleccionaron cuatro estirpes representantes de las posibles combinaciones de genotipos y fenotipos: HSA12, HCC18, HSA46 y HCC43, que corresponden a *C. jejuni* sensible, *C. jejuni* resistente, *C. coli* sensible y *C. coli* resistente, respectivamente (Tabla 2, capítulo 1). Los cebadores diseñados con anterioridad se utilizaron en PCR múltiple sobre preparaciones crudas de DNA bacteriano, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 7. El conjunto de tres cebadores definidos para *C. jejuni* (Zirnstein y col., 1999), que deberían amplificar un fragmento de 368pb en cualquiera de los dos genotipos del polimorfismo C-257-T de *gyrA*, además de un fragmento de 265 pb específico del genotipo mutante que expresa la resistencia a la ciprofloxacina, produjo la amplificación de los fragmentos mencionados en ambos genotipos. Por otro lado, los tres cebadores definidos para *C. coli* (Zirnstein y col., 2000), que deberían amplificar un fragmento de 505 pb en cualquiera de los dos genotipos y un fragmento de 192 pb específico

Resultados

del genotipo mutante, sí dieron lugar a los fragmentos esperados en ambos genotipos, aunque incluyendo de manera adicional un fragmento de menor tamaño.



Puesto que se observó falta de especificidad para los cebadores previamente descritos, sobre todo los correspondientes a *C. jejuni*, se decidió someter a secuenciación el fragmento de *gyrA* que contiene el polimorfismo C-257-T, previamente descrito como principal determinante de resistencia a ciprofloxacina en *Campylobacter*. Para ello se diseñaron dos nuevos cebadores, GgF y GgR, teniendo en cuenta la conservación de secuencias existente entre *gyrA* de *C. jejuni* y *C. coli* (Figura 8). Al incluir un cierto grado de degeneración en las secuencias de estos oligonucleótidos se pretendía posibilitar la amplificación de *gyrA*, para posteriores estudios genotípicos, independientemente de la identidad a nivel de especie de las cepas analizadas.

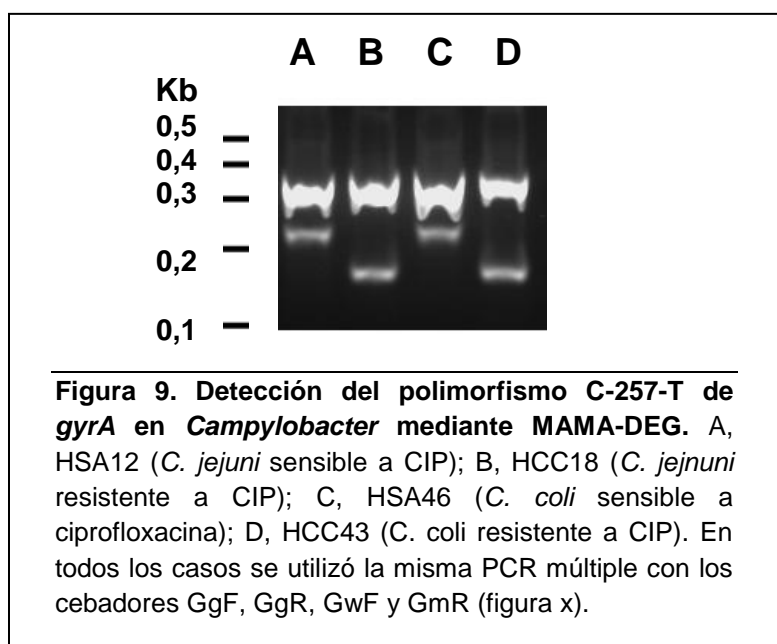


La amplificación con los cebadores GgF y GgR produjo fragmentos de 330 pb en todas las cepas (ver más adelante, Figura 10), cuyas secuencias resultaron ser idénticas a las que se muestran a modo de referencia en la figura 11, salvo por la existencia del polimorfismo C-257-T, presente como se esperaba en las dos cepas resistentes a la ciprofloxacina, además de otros 3 cambios detectados en la cepa HSA12 (Figura 8).

La observación de que los cebadores previamente diseñados no dan buen resultado en PCR múltiple sobre preparaciones crudas, especialmente los dirigidos al polimorfismo C-257-T de *gyrA* en *C. jejuni* (Zirnstein y col., 1999; Figura 7), aún cuando las secuencias de *gyrA* presentes en las cepas utilizadas

Resultados

presentan los determinantes esperados (figura 8), motivó el diseño de unos nuevos cebadores. Al igual que los oligonucleótidos GgF y GgR incluyen degeneraciones que los hacen funcionales con las secuencias de las especies más frecuentes entre los *Campylobacter* termofílicos, *C. jejuni* y *C. coli*, en el diseño de dos cebadores internos, compatibles con los anteriores, se procuró mantener todas las variantes existentes entre las secuencias de *gyrA* de ambas especies. Además, se utilizó la estrategia “MAMA” (Cha y col., 1992) para que cada uno de los dos oligonucleótidos interiores fuese específico de una de las dos variantes del polimorfismo C-257-T de *gyrA*. Así, el oligonucleótido GwF se diseñó específico para el alelo silvestre de *gyrA* (cepas sensibles a la ciprofloxacina), incluyendo un segundo desajuste en la penúltima posición que no debería penalizar en exceso la amplificación de un fragmento de 216 pb desde las secuencias con el alelo silvestre (Figura 8). De la misma manera, el oligonucleótido GmR se diseñó específico para el alelo mutante de *gyrA* (cepas resistentes a la ciprofloxacina), incluyendo un segundo desajuste en la penúltima posición que posibilite la amplificación específica de un fragmento de 159 pb desde las secuencias con el alelo mutante (Figura 8). Por último, simulaciones con el programa “Oligos v6.0” se utilizaron para optimizar la estructura de los oligonucleótidos, asegurando la eficiencia de la PCR y su compatibilidad en una PCR múltiple con los cuatro cebadores.



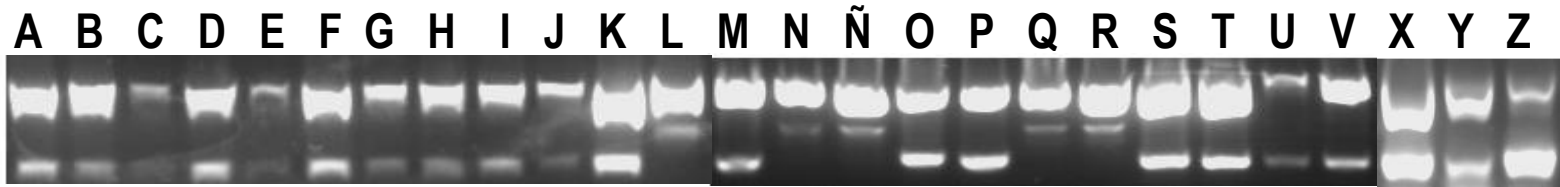
La PCR múltiple con los cuatro oligonucleótidos diseñados en este trabajo, utilizados sobre preparaciones crudas de DNA bacteriano, resultó ser específica de genotipo, con amplificaciones de 330 + 216 pb en el caso de los fenotipos sensibles a la ciprofloxacina, y 330 + 159 pb en el caso de los fenotipos resistentes, de manera eficiente e independiente de la especie de *Campylobacter* termofílico a la que pertenezca la cepa analizada (figura 9).

6.2 Escrutinio del genotipo C-257-T de *gyrA* entre las cepas de *Campylobacter* aisladas de infecciones en humanos

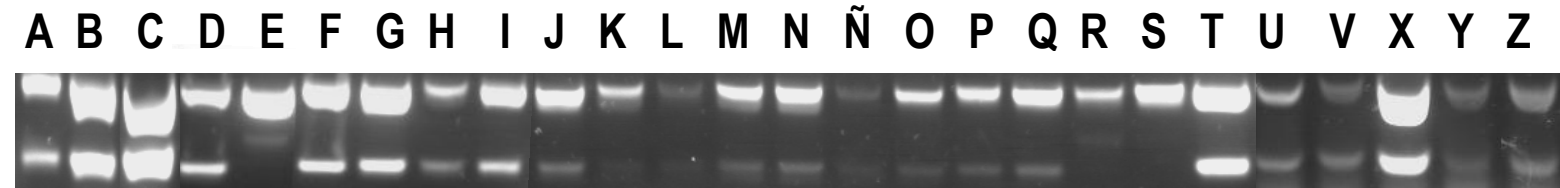
Una vez establecido un protocolo eficiente para llevar a cabo el escrutinio del polimorfismo C-257-T de *gyrA*, éste se llevó a cabo sobre todas las cepas de *Campylobacter* de la colección sujeto de este estudio (Figura 10). Así, el genotipo T-257 de *gyrA* se detectó en 120 cepas, 115 *C. jejuni* y 5 *C. coli*, siendo todas ellas resistentes a la ciprofloxacina (Tabla 6). El genotipo C-257 de *gyrA* se detectó en las restantes 21 cepas, 19 *C. jejuni* y 2 *C. coli*, entre las que hay 9 cepas en el límite de la resistencia (8 cepas de *C. jejuni* con CMI de 1 µg/ml y 1 cepa de *C. coli* con CMI de 2 µg/ml) y 12 cepas totalmente sensibles a la ciprofloxacina. La detección del polimorfismo C-257-T del *gyrA* de *Campylobacter* mediante MAMA-DEG PCR resultó estar asociada al fenotipo de resistencia con CMI > 4 mg/ml, un criterio que se ajusta al punto de corte o “breakpoint” recomendado por el CLSI (CLSI, 2010).

Resultados

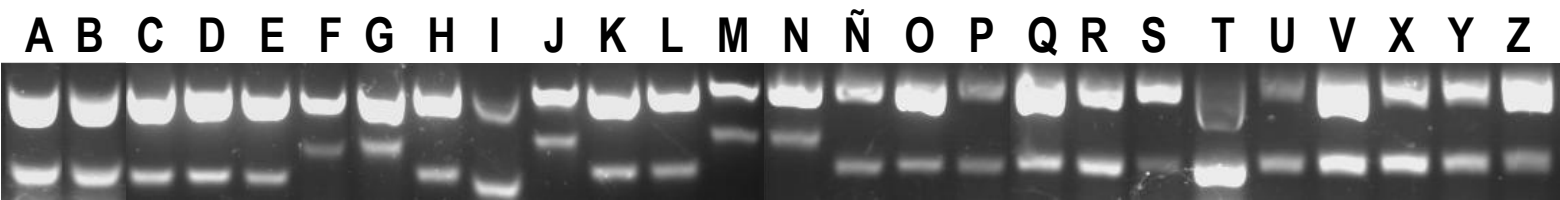
a)



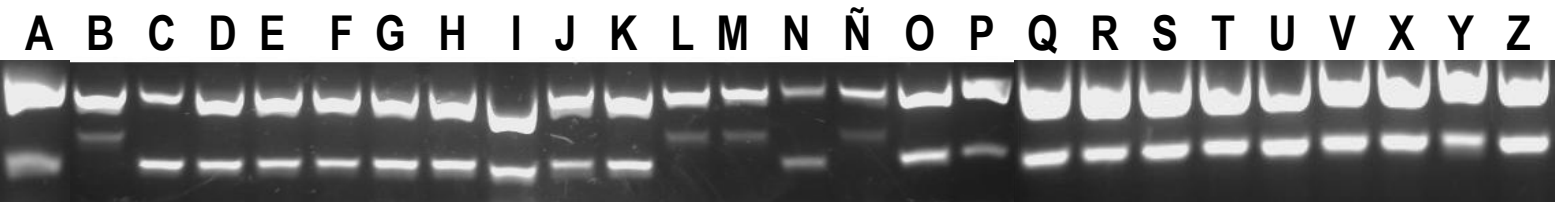
b)



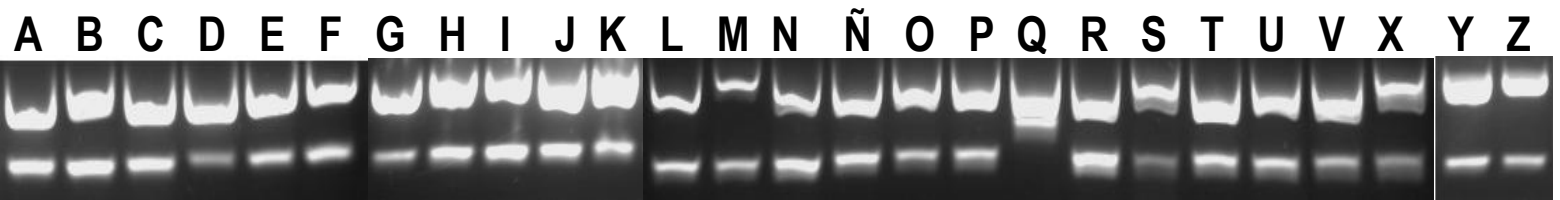
c)



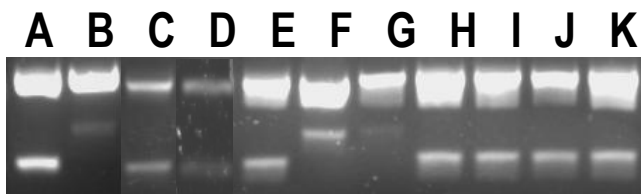
d)



e)



f)



Resultados

Figura 10 (página anterior). Detección de *gyrA* en las cepas de *Campylobacter* de origen humano. Los productos de PCR se separaron en 0,5xTBE y 1,5% de agarosa. Organización de los diferentes paneles¹:

- a) A, HSA1; B, HSA2; C, HSA3; D, HSA4; E, HSA5; F, HSA6; G, HSA7; H, HSA8; I, HSA9; J, HSA10; K, HSA11; **L, HSA12**; M, HSA13; **N, HSA14**; **Ñ, HSA15**; O, HSA16; P, HSA1; **Q, HSA18**; **R, HSA19**; S, HSA20; T, HSA21; U, HSA22; V, HSA 23; X, HSA25; Y, HSA26; Z, HSA27.
- b) A, HSA28; B, HSA29; C, HSA31; D, HSA24; **E, HSA30**; F, HSA32; G, HSA33; H, HSA35; I, HSA45; J, HSA36; K, HSA37; L, HSA38; M, HSA39; N, HSA40; Ñ, HSA41; O, HSA42; P, HSA43; Q, HSA44; R, **HSA46**; **S, HSA47**; T, HSA48; U, HCC2; V, HCC3; X, HCC4; Y, HCC5; Z, HCC8.
- c) A, HCC11; B, HCC14; C, HCC23; D, HCC24; E, HCC25; **F, HCC26**; **G, HCC28**; H, HCC29; I, HCC30; **J, HCC31**; K, HCC32; L, HCC33; **M, HCC34**; **N, HCC35**; Ñ, HCC36; O, HCC37; P, HCC38; Q, HCC41; R, HCC43; S, HCC45; T, HCC46; U, HCC47; V, HCC48; X, HCC49; Y, HCC50; Z, HCC51.
- d) A, HCC52; **B, HCC54**; C, HCC55; D, HCC56; E, HCC57; F, HCC58; G, HCC59; H, HCC60; I, HCC61; J, HCC62; K, HCC63; **L, HCC64**; **M, HCC65**; N, HCC66; **Ñ, HCC67**; O, HCC68; P, HCC69; Q, HCC70; R, HCC71; S, HCC72; T, HCC73; U, HCC74; V, HCC75; X, HCC76; Y, HCC77; Z, HCC81.
- e) A, HCC82; B, HCC83; C, HCC84; D, HCC86; E, HCC87; F, HCC88; G, HCC89; H, HCC90; I, HCC91; J, HCC92; K, HCC95; L, HCC1; M, HCC7; N, HCC10; Ñ, HCC13; O, HCC15; P, HCC16; **Q, HCC17**; R, HCC19; S, HCC20; T, HCC21; U, HCC22; V, HCC40; X, HCC44; Y, HCC6; Z, HCC9.
- b) A, HCC18; **B, HCC27**; C, HNA1; D, HNA2; E, HNA3; **F, HNA4**; **G, HNA5**; H, HNA6; I, HNA7; J, HNA8; K, HNA9.

¹Se señalan en verde las cepas sensibles a la ciprofloxacina.

Tabla 6. Relación entre la resistencia a la ciprofloxacina y el polimorfismo C-257-T de *gyrA* entre las cepas de *Campylobacter* de origen humano.

| Especi | <i>gyrA</i> | CMI (µg/ml) | | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-------------|---|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|
| | | ≤1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | ≥51 |
| C. jejuni | T-257 | 0 | 0 | 0 | 4 | 23 | 48 | 30 | 5 | 1 | 4 |
| | C-257 | 18 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C. coli | T-257 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | C-257 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

6.3 Escrutinio del genotipo C-257-T de *gyrA* en cepas de *Campylobacter* aisladas de animales

La nueva técnica de detección del polimorfismo C-257-T en *Campylobacter* termofílicos se validó frente a cepas de origen animal (cerdo, vacuno o aviar), aisladas y caracterizadas preliminarmente en otros laboratorios (Tabla 7).

Tabla 7. Relación entre el hospedador de procedencia de las cepas, la especie de *Campylobacter* y la resistencia a la ciprofloxacina (incluyendo el polimorfismo C-257-T de *gyrA*) para las cepas de *Campylobacter* de origen animal.

| Hospedador | Especie | F/G ¹ | Aislados ² | Total (%) |
|------------|------------------|------------------|--|-----------|
| Porcino | <i>C. jejuni</i> | R | - | - |
| | <i>C. jejuni</i> | S | - | - |
| | <i>C. coli</i> | R | PO01, PO02, PO03, PO04, PO05, PO06, PO07, PO08, PO09, PO10, PO11, PO13, PO14, PO15, PO16, PO17, PO18, PO19, PO20, PO21, PO22, PO23, PO24, PO26, PO27, PO28, PO29, PO33, PO34, PO35, PO36, PO37, PO39, PO40 | 34 (89,5) |
| | <i>C. coli</i> | S | PO25, PO30, PO31, PO38 | 4 (10,5) |
| | <i>C. jejuni</i> | R | BO01, BO02, BO05, BO06, BO11, BO12, BO13, BO14, BO17, BO19, BO20, BO22, BO23, BO26, BO28, BO29, BO31, BO37, BO39 | 19 (52,7) |
| Bovino | <i>C. jejuni</i> | S | BO03, BO04, BO07, BO09, BO10, BO15, BO16, BO21, BO24, BO30, BO31, BO33, BO34, BO38 | 14 (38,9) |
| | <i>C. coli</i> | R | BO27, BO36, BO40 | 3 (8,3) |
| | <i>C. coli</i> | S | - | - |
| | <i>C. jejuni</i> | R | AVO2, AVO3, AVO4, AVO5, AVO6, AVO9, AV11, AV15, AV21, AV22, AV12, AV20, AV23, AV25, AV29, AV30 | 16 (47,1) |
| | <i>C. jejuni</i> | S | - | - |
| Aviar | <i>C. coli</i> | R | AVO1, AVO7, AVO8, AV10, AV13, AV14, AV16, AV17, AV18, AV19, AV24, AV26, AV27, AV28, AV31, AV32, AV33, AV34 | 18 (52,9) |
| | <i>C. coli</i> | S | - | - |

¹F/G, relación fenotipo (resistencia a la ciprofloxacina) y genotipo (C-257-T de *gyrA*, ver más adelante, figura 11). Las resistencias se determinaron en los laboratorios de origen, correspondiendo R a valores de CMI \geq 8 μ g/ml y S valores de CMI \leq 8 μ g/ml. ²Los aislados porcinos y bovinos proceden de muestreos en granjas realizados por VISAVET (Universidad Complutense de Madrid) durante los años 2010 y 2011, mientras que los aislados aviares proceden de muestreos en mataderos de pollos o en granjas de pollos realizados por el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, durante los años 2010-2012.

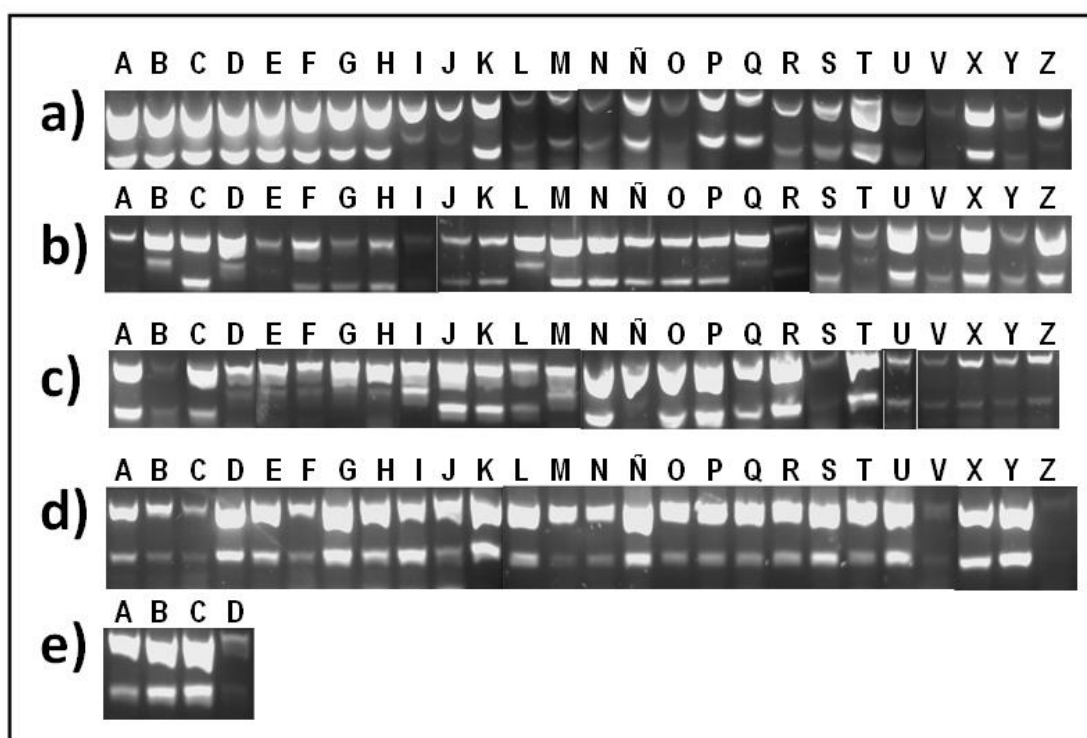
Resultados

Al igual que para las cepas de *Campylobacter* de origen humano, el resultado del muestreo del polimorfismo C-257-T de *gyrA* mostró una correspondencia absoluta con el fenotipo de resistencia a la ciprofloxacina (Tabla 7 y Figura 11). En el total de 108 cepas de *Campylobacter* de origen animal analizadas en este trabajo, el genotipo minoritario C-257 de *gyrA* se detectó en 18 cepas, siendo 14 *C. jejuni* de origen bovino y 4 *C. coli* de origen porcino. Por el contrario, el genotipo T-257 de *gyrA* se observó en 90 cepas, 34 *C. coli* de origen porcino, 19 *C. jejuni* y 3 *C. coli* de origen bovino, y 16 *C. jejuni* y 18 *C. coli* de origen aviar.

Figura 11 (página siguiente). Detección de *gyrA* en las cepas de *Campylobacter* de origen animal. Los productos de PCR se separaron en 0,5xTBE y 1,5% de agarosa. Organización de los diferentes paneles¹:

- a) A, PO01; B, PO02; C, PO03; D, PO04; E, PO05; F, PO06; G, BO01; H, BO02; I, BO03; J, BO04; K, PO07; L, PO08; M, PO09; N, PO10; Ñ, PO13; O, BO11; P, PO14; Q, BO12; R, BO14; S, PO15; T, PO16; U, PO17; V, BO05; X, BO06; Y, PO11; Z, BO07.
- b) A, BO09; B, BO10; C, BO13; D, BO15; E, BO16; F, BO17; G, PO18; H, PO19; I, BO19; J, BO20; K, PO20; L, BO21; M, PO21; N, PO22; Ñ, BO22; O, BO23; P, PO23; Q, BO24; R, BO29; S, PO24; T, PO25; U, BO26; V, PO26; X, PO27; Y, BO27; Z, BO28.
- c) A, PO28; B, PO29; C, BO31; D, PO30; E, BO30; F, BO31; G, BO33; H, BO34; I, PO31; J, BO36; K, PO35; L, BO39; M, PO38; N, BO37; Ñ, BO38; O, PO33; P, PO34; Q, PO36; R, PO37; S, BO40; T, PO39; U, PO40; V, AVO1; X, AVO2; Y, AVO3; Z, AVO4.
- d) A, AVO5; B, AVO6; C, AVO7; D, AVO8; E, AVO9; F, AV10; G, AV11; H, AV12; I, AV13; J, AV14; K, AV15; L, AV16; M, AV17; N, AV18; Ñ, AV19; O, AV20; P, AV21; Q, AV22; R, AV23; S, AV24; T, AV25; U, AV26; V, AV27; X, AV28; Y, AV29; Z, AV30.
- e) A, AV31; B, AV32; C, AV33; D, AV34.

¹Se señalan en verde las cepas sensibles a la ciprofloxacina.



7. Resultados de determinantes de resistencia a la estreptomicina de los aislados de *Campylobacter*

IV. Análisis de los aislados de

7.1 Ámbito de estudio: determinantes de resistencia a la estreptomicina

La resistencia a la estreptomicina está mediada por diversos mecanismos, que incluyen: i) la modificación de su diana, la subunidad pequeña del ribosoma tanto a nivel del rRNA 16S como de la proteína L12; ii) la propia modificación del antibiótico, mediante aminoglicósido nucleotidil-transferasas (ANT) de las familias ANT(3'') y ANT(6) y aminoglicósido fosfo-transferasas (APT) de las familias APH(3'') y APH(6); y 3) la acción de bombas de eflujo (Webber y Piddock, 2003). Entre todos estos mecanismos, en *Campylobacter* sólo se han descrito mutaciones en la proteína L12 y genes que codifican proteínas de las familias ANT(3'') y ANT(6), por lo que se decidió identificar la posible presencia de estos determinantes de resistencia entre las cepas aisladas de humanos.

7.2 Polimorfismo de la proteína RpsL (L12)

Las mutaciones K43R y K88R de la proteína L12 de la subunidad menor del ribosoma son los principales determinantes no transmisibles que confieren resistencia a la estreptomicina en *E. coli* (Funatsu y Wittmann, 1972) *Mycobacterium tuberculosis* (Meier et al., 1996), *Helicobacter pylori* (Torii et al., 2003), entre otras bacterias. En aislados de *C. coli* procedentes de heces de cerdo se ha encontrado únicamente la mutación K-43-R asociada a la elevada resistencia a la estreptomicina (CMI>1024 mg/ml), mientras que ambas mutaciones, K43R y K88R se detectaron en mutantes seleccionados in vitro (Olkola et al., 2010).

Entre las cepas de *Campylobacter* analizadas en este trabajo, únicamente 16 aislados presentaron resistencia a la estreptomicina (Tabla 2) siguiendo los criterios de EUCAST (CMI>4µg/ml). De éstos, sólo dos cepas de *C. jejuni* presentaron resistencia máxima en el intervalo ensayado (>512 µg/ml), un grupo de 4 cepas de *C. jejuni* y 3 de *C. coli* correspondieron a fenotipos de resistencia muy significativa pero inferior al máximo ($32 \leq \text{CMI} \leq 256 \mu\text{g/ml}$), mientras que por último, 6 cepas de *C. jejuni* y 1 de *C. coli* presentaron valores de resistencia intermedia, inmediatamente por encima del límite recomendado

por EUCAST (CMI=8 µg/ml). Para detectar la posible existencia de mutaciones en el gen *rpsL* se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento interno de su secuencia codificante, analizándose su secuencia en las 16 cepas resistentes a la estreptomicina (Figura 12). En el fragmento de 142 pb secuenciado se detectaron 11 posiciones polimórficas, entre las cuales sólo una se expresa en la proteína codificada originando la variante K43R que había sido previamente detectada en la proteína L12 de aislados de *C. coli* expresando valores máximos de resistencia a la estreptomicina (Olkola et al., 2010). Las dos cepas que presentan la mutación K43R de la proteína L12 detectadas en el presente trabajo son los únicos aislados que expresan valores máximos de resistencia y han sido identificadas como pertenecientes a la especie *C. jejuni* (≥512 µg/ml; figura 15).

Figura 12. Polimorfismo de la secuencia (parcial) del gen *rpsL* de *Campylobacter*. Un fragmento interno de 142 pb se amplificó mediante PCR con los cebadores definidos en la tabla 2 (Olkola et al., 2010). Las posiciones polimórficas se muestran sombreadas en amarillo, si con cambios silenciosos, o rojo, cuando se expresan en la proteína codificada, que se indica en la última línea.

```

HCC2 126-CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG-197
HCC4  CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC26 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC27 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC30 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC32 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC34 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC40 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC56 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HCC86 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HSA16 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HSA28 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HSA32 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HSA40 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HSA46 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
HNA157 CCTAAAAAACCAAACTCAGCGTTAAGAAAAGTTGCCAAAGTAAGACTTACTAGTGCGCTTTGAAGTGATCAG
*****
P K K P N S A L R K V A K V R L T S G F E V I S-65
R-43

HCC2 198-CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG-269
HCC4  CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC26 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC27 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC30 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC32 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC34 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC40 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC56 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HCC86 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HSA16 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HSA28 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HSA32 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HSA40 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HSA46 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
HNA157 CTATATCGGCGGTGAAGGTCATAACTTGCAAGAACACAGCATTGTTTAGTGGGTGGTAGGGTAAAAG
*****
Y I G G E G H N L Q E H S I V L V R G R V K-88

```

7.3 Escrutinio de la familia ANT(3'') en *Campylobacter*

La expresión de genes de la familia *ant*(3''), también denominados genes *aadA*, constituye uno de los determinantes de resistencia más frecuentes de las enterobacterias, donde se ubican en cassettes génicas asociadas a los integrones de tipo I y confieren resistencia simultánea a la estreptomicina y a la espectinomicina (Boyd et al., 2001). Aunque se ha descrito la identificación de genes *ant*(3'') en *Campylobacter* termofílicos aislados en Irlanda, localizados en cassettes génicas muy similares a las de enterobacterias (O'Halloran et al., 2004), no existen referencias posteriores que acrediten este hallazgo, a pesar de haberse buscado en cepas de *Campylobacter* procedentes de varios países (van Essen-Zandberget al., 2007; Piccirillo et al., 2013). En el presente trabajo no se ha ensayado la resistencia frente a la espectinomicina de las cepas de *Campylobacter*, por lo que no se puede deducir la presencia de genes *aadA* de sus datos fenotípicos. Sin embargo, un escrutinio realizado mediante dos PCRs, una con cebadores específicamente dirigidos frente a la secuencia de *int1* y la otra para las cassettes génicas asociadas a *int1* (Tabla 1), no detectó la existencia de este tipo de elementos en las cepas de *Campylobacter* resistentes a la estreptomicina, utilizándose como control positivo una cepa de *S. entérica* que sí las presenta (resultados no mostrados; (Campos et al., 2013).

7.4 La familia ANT(6) en *Campylobacter*

La identificación y el análisis en *Campylobacter fetus* de un gen de la familia *ant*(6), también denominada *aadE*, permitió establecer las relaciones filogenéticas de las proteínas codificadas mediante la definición de cuatro subfamilias, ANT(6)-Ia hasta ANT(6)-Id (Abril et al., 2010). En este estudio pionero se compararon 10 secuencias de bacterias gram positivas, además de la mencionada secuencia de *C. fetus* (CBH51824) y otra estrechamente relacionada de *C. jejuni* (Q4VRA5), quedando ambas incluidas en la subfamilia ANT(6)-Ib. En el momento de iniciar este trabajo se rastrearon las bases de datos y se encontraron cinco nuevos homólogos de la familia ANT(6) en *Campylobacter*, algunos representados por múltiples secuencias prácticamente idénticas, eligiéndose como representantes los siguientes: AFJ97264,

AFJ97257, CAD35323, ZP_14079546.1 y ZP_01070142. Se decidió entonces incorporar estas cinco secuencias al alineamiento múltiple para valorar su relación con las cuatro subfamilias de ANT(6), observándose que AFJ97257 (*C. coli*) y CAD35323 (*C. jejuni*) pertenecen a la subfamilia ANT(6)-Ia y que AFJ97264, además de las ya mencionadas CBH51824 y Q4VRA5, de *C. fetus* y *C. jejuni*, respectivamente, se agrupan dentro de ANT(6)-Ib (Figura 16). Las dos secuencias restantes, ZP_14079546.1 y ZP_01070142, proceden de genomas de cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente, y pertenecen a un grupo filogenético diferente del resto de secuencias, que a falta de su caracterización funcional (ver más adelante) será denominado ANT(6)-Ie.

7.5 Escrutinio de genes *ant(6)* entre las cepas de *Campylobacter*

Una búsqueda mediante el programa “Blastp” en la base de datos “nr” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; consultada el 8/10/2015) permitió identificar en *Campylobacter* 12, 11 y 47 secuencias de las familias ANT(6)-Ia, ANT(6)-Ib y ANT(6)-Id, respectivamente. Considerando de manera conjunta los 496 genomas secuenciados de *C. jejuni*, los 156 de *C. coli* y 16 secuencias adicionales de plásmidos y fragmentos genómicos, se obtienen frecuencias relativas de 1,8%, 1,6% y 7,0% para la prevalencia de las tres subfamilias en *Campylobacter*. Entre las cepas analizadas en este trabajo, las cepas resistentes a la estreptomicina representan un 11,3% del total, un 6,4% si se consideran únicamente las cepas con CMI>8mg/ml (capítulo 1), por lo que cabe plantear la hipótesis de que los genes *ant(6)* estén presentes en las cepas analizadas con frecuencias similares a las detectadas en bases de datos génicos, siendo sus principales determinantes de resistencia.

A

ANT(6)-Ia
ANT(6)-Ic
ANT(6)-Ib
ANT(6)-Id
ANT(6)-Ie

ANT(6)-Ia
ANT(6)-Ib
ANT(6)-Ic
ANT(6)-Id
ANT(6)-Ie

ANT(6)-Ia
ANT(6)-Ib
ANT(6)-Ic
ANT(6)-Id
ANT(6)-Ie

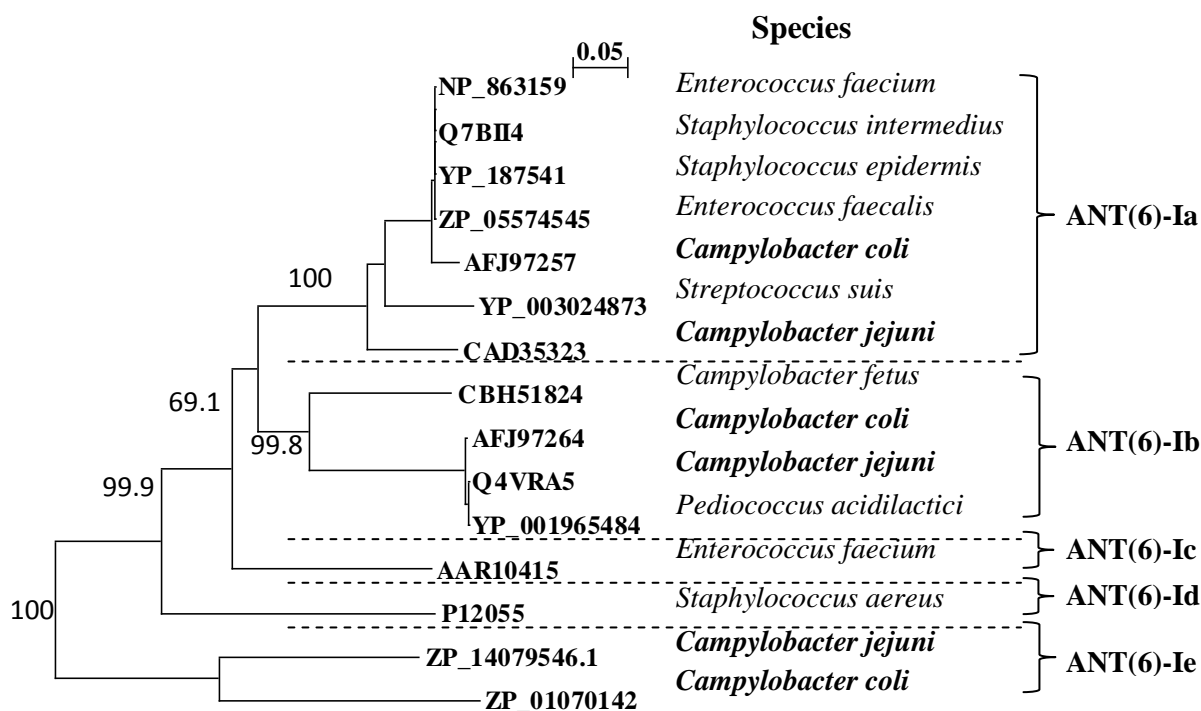
B

Figure 13. La familia ANT(6) y sus representantes en *Campylobacter*. A, alineamiento múltiple de las secuencias ANT(6) elaborado mediante Clustal X 2.1. La flecha roja indica el residuo polimórfico detectado entre las secuencias obtenidas de las cepas de *C. coli* analizadas en este trabajo. B, árbol filogenético deducido mediante el algoritmo “neighbor joining”, excluyendo posiciones con inserciones/delecciones, emulado con el programa NJPlot 2.3. La técnica de remuestreo (“bootstrapping”) fue empleada para determinar la significatividad estadística de los agrupamientos, cuyo valor en % se indica en los nodos que sostienen la definición de subfamilias de ANT(6). La regla muestra la escala de la longitud de las ramas, que expresa la divergencia relativa en tanto por uno.

Resultados

Para detectar la presencia de genes de las subfamilias *ant(6)-la*, *ant(6)-lb* y *ant(6)-le* se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: i) mantener la mayor identidad posible entre las secuencias de *C. jejuni* y *C. coli* dentro de cada subfamilia, incluyendo en caso de necesidad posiciones degeneradas; ii) seleccionar regiones con divergencia significativa entre los genes de las distintas subfamilias, y iii) mantener los límites de estabilidad definidos por el programa “Oligo v6.0”, utilizado para el diseño de los cebadores (Figura 14).

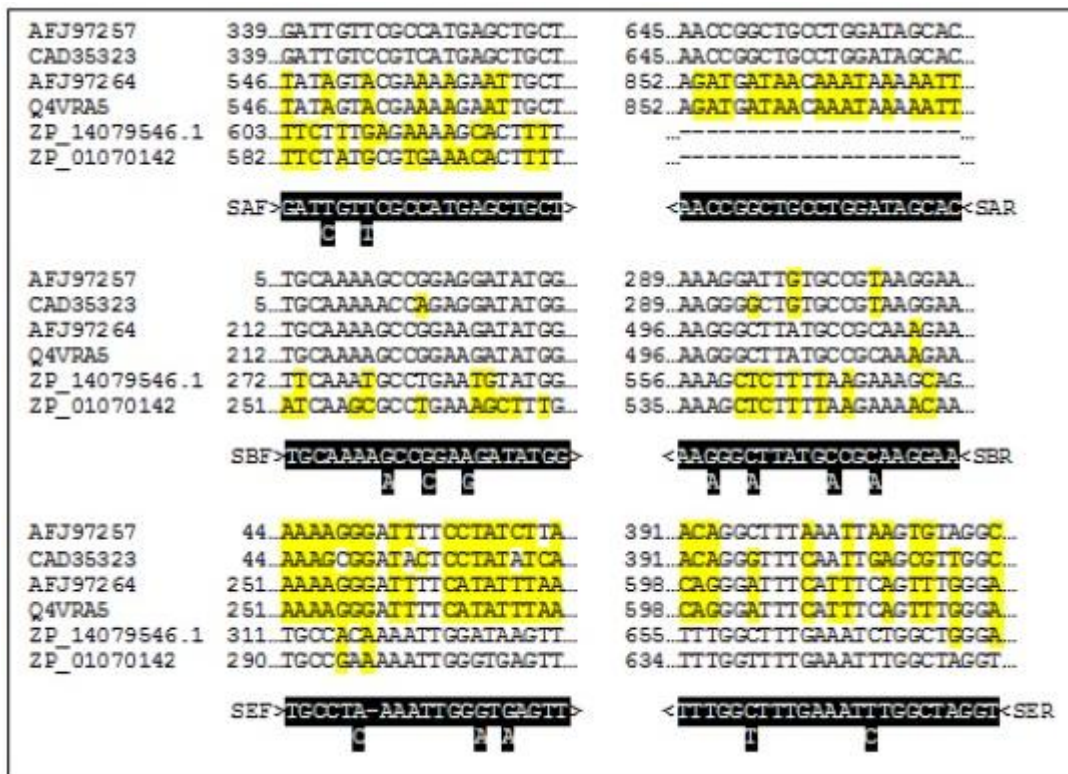


Figura 14. Diseño de cebadores para PCR específicas de los genes *ant(6)* de *Campylobacter*. Sobre un alineamiento múltiple realizado mediante Clustal-omega con las secuencias codificantes (la numeración comienza en el ATG de inicio) de los miembros de las familias ANT(6)-la (AFJ97257 y CAD35323), ANT(6)-lb (AFJ97264 y Q4VRA5) y ANT(6)-le (ZP_14079546.1 y ZP_01070142), se han extraído los fragmentos sobre los que se han diseñado los oligonucleótidos para la identificación génica. Debajo de cada fragmento del alineamiento se muestran los distintos oligonucleótidos, que son: SAF y SAR, para ANT(6)-la; SBF y SBR, para ANT(6)-lb; y SEF y SER, para ANT(6)-le; siendo F, oligonucleótido de la cadena superior; y R, oligonucleótido de la cadena inferior. Las diferencias entre las secuencias codificantes y los cebadores se resaltan en fondo amarillo, mientras que las secuencias en fondo negro corresponden a los cebadores, incluyendo las posiciones degeneradas. Sólo se muestra la cadena de arriba para ambos tipos de cebadores, F y R.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el objetivo de mantener una especificidad relativamente elevada para cada subfamilia de genes *ant(6)*. Así, las parejas SAF/SAR, SBF/SBR y SEF/SER deberían ser claramente específicas para las subfamilias *ant(6)-Ia*, *ant(6)-Ib* y *ant(6)-Ie*, respectivamente (Figura 14), atendiendo a los criterios de especificidad ya explicados para el diseño de los oligonucleótidos de la MAMA-DEG PCR descritos en este mismo trabajo (Capítulo 2). Las secuencias de fragmentos de PCR obtenidos con las tres parejas de cebadores permitieron ratificar la especificidad de las amplificaciones (resultados no mostrados).

La utilización de los cebadores diseñados para los genes *ant(6)* permitió definir el genotipo de las cepas resistentes a la estreptomicina (Figura 18). Una única cepa de *C. jejuni*, HCC56, presentó *ant(6)-Ia*, mientras que en otras dos cepas de *C. jejuni*, HCC2 y HCC4 se identificó la presencia de *ant(6)-Ib*. El determinante de resistencia más prevalente resultó ser *ant(6)-Ie*, detectado en 7 cepas, 3 *C. coli* y 4 *C. jejuni*, siendo una de estas últimas, HCC2, la única cepa detectada que contiene dos genes *ant(6)* de distinta subfamilia. Dos de las cepas de *C. jejuni* con genes *ant(6)-Ie*, HSA32 y HSA40, presentan la mutación K43R de RpsL que confiere el máximo nivel de resistencia a la estreptomicina (Figura 12).

Entre las cepas analizadas, la presencia de genes *ant(6)* confiere valores de resistencia a la estreptomicina sensiblemente superiores (CMI > 8 µg/ml) al límite establecido por EUCAST (ECOFF de 4 µg/ml). Por el contrario, el grupo de 7 cepas con valores de CMI solo ligeramente superiores al ECOFF de EUCAST (CMI = 8 µg/ml), 6 *C. jejuni* y una *C. coli*, carecen de genes *ant(6)* ni de ningún otro determinante conocido de resistencia a la estreptomicina (Figura 15).

Resultados

| Isolate | Species | STR ¹ | STR+PAβN ² | <i>ant(6)-Ia</i> | <i>ant(6)-Ib</i> | <i>ant(6)-Ie</i> | RPSL ⁴ |
|---------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| HSA16 | <i>C. coli</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HSA28 | <i>C. coli</i> | 128 | 16 | | | | WT |
| HSA32 | <i>C. jejuni</i> | >512 | ¿? | | | | K43R |
| HSA40 | <i>C. jejuni</i> | >512 | >512 | | | | K43R |
| HSA46 | <i>C. coli</i> | 64 | 16 | | | | WT |
| HCC2 | <i>C. jejuni</i> | 128 | 16 | | | | WT |
| HCC4 | <i>C. jejuni</i> | 32 | 0,03 | | | | WT |
| HCC26 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HCC27 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HCC30 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HCC32 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HCC34 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HCC40 | <i>C. jejuni</i> | 8 | 0,03 | | | | WT |
| HCC56 | <i>C. jejuni</i> | 256 | 0,03 | | | | WT |
| HCC86 | <i>C. jejuni</i> | 128 | 32 | | | | WT |
| HNA157 | <i>C. coli</i> | 32 | 8 | | | | WT |

Figura 15. Análisis fenotípico y genotípico de los aislados resistentes a la estreptomicina. Se muestran los datos previamente referidos de identificación a nivel de especie y CMI¹(Tabla 2) y del genotipo de la proteína RpsL (Figura 12; WT, tipo silvestre). Los genes *ant(6)-I* se amplificaron por PCR empleando los cebadores cuyo diseño se muestra en la figura 14, en las condiciones indicadas en el capítulo “Materiales y Métodos”.

7.6 Análisis comparativo de las secuencias de genes *ant(6)-I* identificados entre las cepas de *Campylobacter*

Entre las 9 cepas de *Campylobacter* que expresan resistencia muy significativa a la estreptomicina (CMI > 8 µg/ml), la mayoría presentan el gen *ant(6)-Ie*, siendo éste el único gen de la familia *ant(6)* en 6 cepas, 3 de la especie *C. jejuni* y 3 de *C. coli*. Para analizar estos genes se diseñaron cebadores (Tabla 1) sobre los extremos 5' y 3' de las secuencias codificantes utilizadas como referencia en este trabajo, ZP_14079546.1 (*C. coli*) y ZP_01070142 (*C. jejuni*), se obtuvieron los fragmentos de PCR correspondientes y se determinaron sus secuencias (Figuras 19A y 19B).

Resultados

La comparación de los genes *ant(6)-le* de las tres cepas de *coli* que presentan este único representante de la familia *ant(6)* con la secuencia codificante de la proteína ZP_14079546.1, utilizada como referencia de ANT(6)-le en este estudio, muestra un único polimorfismo, C-466-T, en la secuencia de la cepa HNA157 (Figura 16A). Esta substitución, que origina la variante P-156-S en la proteína codificada, no se detecta en ninguna de las secuencias accesibles para su comparación en la base de datos NRprot del NCBI. Atendiendo a la homología existente entre las secuencias de la familia ANT(6), la substitución P-156-S no corresponde a una posición conservada entre los miembros de la familia (Figura 13). En el caso de las secuencias codificantes obtenidas para ANT(6)-le entre las cepas de *C. jejuni* identificadas en este trabajo, comparadas con la de ZP_01070142, se observó la existencia de un único polimorfismo, Δ -394, que produce la sustitución P-132-L seguido de una parada abrupta de la traducción, lo que origina una proteína truncada en 160 residuos de su extremo C-terminal, lo que equivale a un 55% de su estructura primaria.

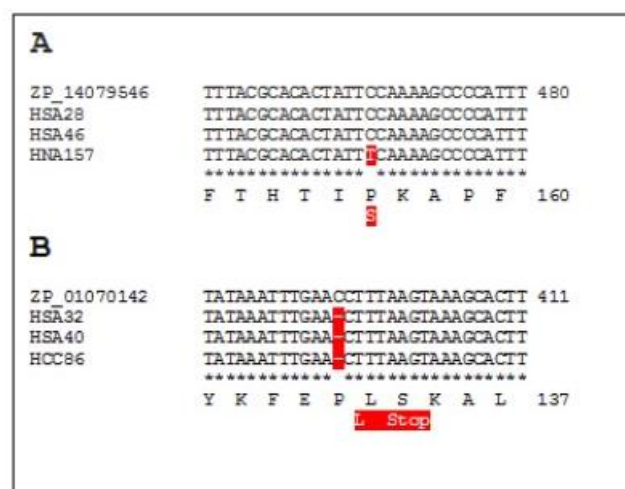


Figura 16. Polimorfismo de los genes *ant(6)-le*. Se muestra únicamente el fragmento de las secuencias dónde se localizaron polimorfismos, siendo el resto de las secuencias codificantes idénticas a las de ZP_14079546.1 y ZP_01070142, utilizadas como referencias en este trabajo. Las secuencias se obtuvieron mediante PCR con las parejas de cebadores STREJ-F/STREJ-R y STREC-F/STREC-R (Tabla 2) sobre *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente. Los apilamientos múltiples de las secuencias obtenidas de las cepas de *C. coli* (**A**) y *C. jejuni* (**B**) se obtuvieron con el programa Clustal-omega. La numeración de las secuencias se refiere al codón de inicio de la secuencia codificante y al primer residuo de la proteína codificada en las secuencias de referencia.

7.7 Expresión funcional de *ant(6)-le* en *Escherichia coli*

Para comprobar la funcionalidad de la proteína ANT(6)-le se llevó a cabo la amplificación de su secuencia codificante desde el genoma de la cepa HNA157. El análisis del genoma de la cepa *C. coli* Z163 (ASM25345v2), en la que se detectó la secuencia codificante de la proteína ANT(6)-le utilizada como referencia en este trabajo (ZP_14079546.1), permitió identificar su posible secuencia promotora (Figura 17), teniendo en cuenta que los promotores σ^{70} de *Campylobacter* presentan una caja -10 bien conservada y que carecen de la típica caja -35 presente en otras bacterias (Petersen et al., 2003).

Tras el diseño de una pareja de cebadores cuya posición abarca el posible promotor y la secuencia codificante del gen *ant(6)-le* de *C. coli*, se amplificó el fragmento de DNA correspondiente y se clonó en el vector pGEM-T easy mediante su transformación en la cepa XL₁-Blue MRF' de *E. coli*, según los procedimientos descritos en el capítulo de Materiales y Métodos. Dos de los clones obtenidos se secuenciaron desde los cebadores universales (T7 y T3) del plásmido, observándose la integridad de la secuencia codificante de ANT(6)-le y su orientación en el sentido de la transcripción del gen lacZ. Por último se determinó la MIC para la estreptomicina de los clones recombinantes obtenidos, en paralelo a la cepa XL₁-Blue MRF' transformada con el vector pGEM-T easy no recombinante, obteniéndose valores de 64 y 4 mg/ml, respectivamente, independientemente de la presencia o no de IPTG (0,1 mM) en el medio de cultivo.

```
>GTATGCGCAAAAATGATTAAAGTTTTTCATTTTTCTCCTTTTTTTTATATTTGTTGC
ATTATAAAATATAAGAGTAACAAAGCTTGCAAAATATAAAATATTA TTGTATAAT TAA
AATCATTTTT AAGGC CATGATC... (894bases) ... TAA TTATTTTCCTTTCTAGCTTT
ATCTTAATCTTTATGCTTGATTATATATTTTTCTAAAGTATTTTTTATCTTTATTGAA
ACCAATATTTAAATTTTCCTT<
```

Figura 17. Entorno génico de *ant(6)-le* en *C. coli* Z163. Las 894 de secuencia codificante de ZP_14079546.1 se han omitido del esquema. Se muestran: en azul, el codón de inicio de la traducción; en rojo, el codón de parada; en verde, la caja -10 (σ^{70}); en verde, la secuencia “Shine-Dalgarno”; subrayados, los cebadores STRC-F y STRC-R utilizados en la PCR para la expresión génica en *E. coli*.

8. Discusión.

8.1 Caracterización fenotípica de las cepas de *Campylobacter*

Un 95% de los aislados clínicos a los que hace referencia el presente trabajo, que han producido trastornos gastrointestinales (diarreas) en el hombre, pertenecen a la especie *C. jejuni*, correspondiendo el resto a *C. coli*.

Entre los distintos antimicrobianos ensayados, que incluyen los compuestos de mayor relevancia clínica en el tratamiento de la campilobacteriosis, la resistencia a **eritromicina** es muy baja, apareciendo en el 0.76% de *C. jejuni* y no se da en ningún *C. coli*. Un estudio llevado a cabo en Brasil cita la resistencia a este antibiótico en el 9.1% de los casos (Aquino et al., 2002). En Canadá la sitúan entre un 0 y un 12.6%, aunque en la mayoría de las cepas suele ser menor del 5% (Gaudreau y Gilbert, 1998) como ocurre en nuestro trabajo. Por el contrario, existen estudios donde sitúan la prevalencia en niveles más altos, 31% (Kurincic et al., 2012) y otros que prevén una tendencia alcista en la aparición de cepas resistentes a este antimicrobiano en el hombre (Aarestrup y Engberg, 2001).

La resistencia a **ciprofloxacina** en las cepas estudiadas es de un 91.67% en *C. jejuni* y un 85.7% en *C. coli*, dato superior al descrito por Prats, que sitúa la resistencia a quinolonas en cepas aisladas en Barcelona en el 82% (Prats et al., 2000), otro trabajo también cita una resistencia bastante alta en nuestro país, del 67.5% (Alonso et al., 2004) lo que contrasta con otros autores que barajan datos inferiores, en torno al 45% (Kurincic et al., 2012), e incluso existen estudios donde no se describen aislados humanos resistentes a ciprofloxacina (Lucey et al., 2000b). El 91.67% de los *Campylobacter jejuni* de nuestro estudio fueron resistentes, mientras que en *Campylobacter coli* el porcentaje fue ligeramente inferior (85.7), en trabajos anteriores describen lo inverso, una mayor resistencia en *C. coli* que en *C. jejuni* (Aquino et al., 2002, Prats et al., 2000). Los resultados del presente trabajo sugieren la existencia de una tendencia alcista en la prevalencia de la resistencia a ciprofloxacina en *Campylobacter* de origen humano, reflejando todavía, probablemente, el efecto del uso de estos antimicrobianos en animales, no pudiendo descartarse tampoco la posible contribución de su utilización en humanos.

Hemos encontrado un porcentaje de cepas humanas no sensibles a **tetraciclina** muy elevado (96.2% en *C. jejuni* y 85.7% en *C. coli*) y bastante superior a lo descrito previamente por otros autores. En Canadá, la prevalencia de cepas resistentes fue del 55.7% (Gaudreau y Gilbert, 1998), en Reino Unido del 24.5% (Lucey et al., 2000a), mientras que en España se registra uno de los datos más altos encontrados en la bibliografía, un 72% (Prats et al., 2000), siendo aún superior la resistencia descrita en Taiwan, 78% (Lee et al., 1994), mientras que en Brasil no se detectan resistencias a tetraciclina en los aislados humanos (Aquino et al., 2002). A pesar de esta heterogeneidad de datos, se puede afirmar que la resistencia a tetraciclina está viéndose incrementada en los últimos tiempos, no coincidiendo con la tendencia a la baja de la resistencia a éste antimicrobiano a la que hacen referencia Aarestrup y Engberg (2001).

Por otra parte, se ha observado una prevalencia muy baja de cepas resistentes a **gentamicina** (0.76% en *C. jejuni*, no observándose en *C. coli*), lo que coincide con lo descrito previamente por otros autores en varios países que la sitúan en menos del 1% (Qin et al., 2012). La prevalencia de *Campylobacter* resistentes a los aminoglicósidos está catalogada como baja en la literatura (Aarestrup y Engberg, 2001), sin embargo el porcentaje de resistencia a **estreptomicina** hallado en nuestro estudio es del 9.1% en *C. jejuni* y 57.14% en *C. coli*.

Por lo tanto, analizados los datos anteriores, podemos concluir que el antibiótico de elección en el tratamiento de infecciones producidas por *Campylobacter* spp., considerando su efectividad (baja tasa de resistencia), es la eritromicina, como también señalan otros autores (Luangtongkum et al., 2009, Aquino et al., 2002). Y en el caso de ser necesario una droga alternativa, ya que por las características de la infección podría estar indicado el empleo de un aminoglicósido, se preferirá la gentamicina en lugar de la estreptomicina, ya que la resistencia es considerablemente inferior.

Tras el inicial análisis fenotípico de la colección se decidió llevar a cabo el estudio genotípico, empleando técnicas moleculares, de la resistencia detectada frente a los antimicrobianos ensayados frente a las cepas de *Campylobacter* de origen humano, con la intención de comprender los

mecanismos de resistencia y su potencial de dispersión, mejorando si cabe su diagnóstico ya que lo indicado en los test de sensibilidad es combinar métodos fenotípicos y genotípicos (Moore et al., 2006).

8.2 Análisis de la resistencia a la tetraciclina

El 100% de los aislados de *Campylobacter* resistentes a tetraciclina (CMI \geq 8 μ g/ml) albergaban el gen *tet(O)*, amplificado con los primers tetOF y tetOR, en primer lugar, y tetDF y tetDR a continuación, para aclarar la situación de la única cepa resistente cuyo genotipo no había sido identificado. Se comprobó también que ninguna de las cepas sensibles presentaba este gen, lo mismo que ocurre en estudios realizados previamente (Kurincic et al., 2012, Dasti et al., 2007, Obeng et al., 2012). Por tanto, este trabajo muestra que, al igual que en otros contextos geográficos, *tetO* es el principal determinante de resistencia a la tetraciclina en las cepas de *Campylobacter* de origen humano aisladas en España.

Aunque los cebadores tetOF y tetOR (Bacon et al., 2000) han permitido detectar el gen *tet(O)* en el 99.1% de los casos, se nos hizo indispensable recurrir a los primers tetDF y tetDR (degenerados) para localizarlo en todas las cepas resistentes. En un trabajo previo, los cebadores tetOF y tetOR detectaron el gen en el 97.8% de los aislados, por lo que también hubo que aplicar una técnica alternativa, en ese caso fue un análisis Southern-Blot (Pratt y Korolik, 2005).

La secuencia *tet* de las dos cepas analizadas en este trabajo, HCC30 y HCC43, son distintas entre sí. La HCC43 tiene un 100% de identidad frente a genes *tetO* de los plásmidos pRM4661 y pN29710-1 de *C. coli* y a la secuencia genómica de *C. jejuni* IA3902. Mientras que la HCC30 es semejante a las secuencias de las cepas de *Campylobacter coli* siguientes: pCC31 (Batchelor et al., 2004), SH-CCD11C365, SH-CCD11C073 y DZB4 (Wang et al., 2014).

La secuencia *tet* de la cepa HCC30, corresponde a un gen mosaico con estructura *tetO/tetM/tetO*, con una primera zona de identidad total con *tetO*, a continuación con *tetM* y después con *tetO* nuevamente. Mientras que la secuencia del gen *tet* de la cepa HCC43 es idéntica al gen *tetO* en toda su

extensión. Esta es la razón que explica que la cepa HCC30 no se pudiese amplificar con los cebadores específicos y hubiera que recurrir a los cebadores degenerados. Todas las quimeras *tetO/tetM/tetO* detectadas en *Campylobacter* y presentes en bases de datos génicos tienen la misma estructura, por lo que deben proceder de un mismo evento de recombinación entre ambos genes. Mientras que el gen *tetO* está muy extendido en *Campylobacter*, *tetM* únicamente se ha detectado en las quimeras mencionadas, y sus homólogos más próximos (idénticos en muchos casos) se encuentran en bacterias Gram-positivas, organismos de los que debe haberse movilizado esta secuencia hacia *Campylobacter*. Resulta destacable señalar en este punto que las bacterias dónde se han detectado quimeras *tetO/tetM/tetO* presentan una elevada resistencia frente a la tetraciclina, con valores de CMI $\geq 512 \mu\text{g/ml}$ (Batchelor et al., 2004; este trabajo).

Con las conjugaciones llevadas a cabo en este trabajo se ha detectado movilización de la resistencia a la tetraciclina entre cepas de *Campylobacter*, siendo la cepa donadora *C. coli*, la receptora *C. jejuni* y la frecuencia de conjugación 1.5×10^{-6} transconjugantes por célula donadora. Cifra similar a lo recogido por otros autores en trabajos previos con plásmidos que conferían resistencia a tetraciclina. Así, Pratt y Korolik (2005) describen una frecuencia que oscila entre 0.8×10^{-8} y 2×10^{-6} . Un rango aún más amplio de frecuencias fue observado en uno de los primeros trabajos donde se realizaron estos ensayos, entre 5×10^{-9} y 5×10^{-3} transconjugantes por célula donadora (Tenover et al., 1985).

Como ya se ha señalado con anterioridad, la localización del gen *tet(O)* puede ser tanto plasmídica como cromosómica. En este trabajo, el hecho de que se haya transmitido horizontalmente la resistencia a tetraciclina, mediante los experimentos de conjugación, en solo una de las tres cepas probadas, induce a pensar que la localización es plasmídica en la cepa positiva en la conjugación y cromosómica en el resto. Una frecuencia similar de cepas de *Campylobacter* resistentes a tetraciclina que albergaban plásmidos fue descrito en Canadá (Gibreel et al., 2004), lo que también se corresponde con lo citado por Tenover y colaboradores (1985), que los detectan en un tercio de los aislados. Sin embargo, en Taiwan encontramos un estudio que refleja una

localización plasmídica del gen *tet(O)* ligeramente superior (47%) a la cromosómica (41%; Lee et al., 1994). Sorprendente resulta lo expuesto en un trabajo realizado con cepas aisladas en Brasil, en el que en ninguna de las cepas resistentes a tetraciclina fueron detectados plásmidos (Aquino et al., 2002). Pratt y Korolik (2005) describen la localización en plásmidos del gen *tet(O)* en el 32.3% de los aislados, y el 76 % en el cromosoma, además apuntan que de las cepas que albergaban el gen en plásmidos, sólo la mitad fue capaz de transferir la resistencia a tetraciclina a la cepa receptora mediante conjugación; lo que abre la posibilidad de que, en el presente trabajo, podría existir una mayor ubicación plasmídica del gen y que no estuviese siendo transferido por conjugación. En este sentido se han descrito barreras a la transferencia por conjugación como son el propio rango de hospedadores del plásmido, la incompatibilidad entre plásmidos, la incapacidad de éstos de replicarse en la célula receptora, la especificidad de las cepas y la existencia de sistemas de restricción, que pueden ser responsables de la ausencia de transferencia de resistencia a tetraciclina en algunas cepas (Pratt y Korolik, 2005).

La localización en plásmidos del determinante de resistencia a la tetraciclina *tet(O)* podría explicar la extensa distribución de cepas humanas resistentes a nivel mundial. Uno de los factores que, probablemente, ha contribuido a esta dispersión de plásmidos movilizables es el uso de tetraciclina en avicultura (Batchelor et al., 2004). Incluso se ha descrito como se produce transferencia espontánea de *tet(O)* *in vivo* entre cepas de *C. jejuni* en el tracto digestivo de pollos (Avrain et al., 2004).

8.3 Análisis de la resistencia a la ciprofloxacina

La gran prevalencia de cepas resistentes a ciprofloxacina, unido al hecho de que los tests de susceptibilidad para *Campylobacter* por dilución en caldo o agar y la identificación de la mutación por secuenciación de DNA sean métodos relativamente lentos, hace conveniente el desarrollo de técnicas más eficientes, rápidas y reproducibles, que permitan diagnosticar la resistencia a la ciprofloxacina en cepas de *Campylobacter* (Dionisi et al., 2004).

Los métodos de diagnóstico molecular por MAMA-PCR descritos por Zirnstein permiten detectar, mediante dos PCRs, las cepas resistentes de *C. jejuni* y *C. coli*, aunque se requiere la identificación previa a nivel de especie de dichos microorganismos. Así, en el caso de la PCR descrita para *C. jejuni*, mediante el empleo de tres cebadores se obtiene una banda común de 368 pb en todos los aislados de esta especie, más un producto de 265 pb únicamente en aquellos microorganismos que presenten la mutación Thr-86-Ile en el gen *gyrA* de *Campylobacter jejuni* (Zirnstein et al., 1999). En el caso de *C. coli* el abordaje es muy similar, variando las secuencias de los tres cebadores y originándose fragmentos de 505 pb en todos los casos, y de 192 pb sólo en los microorganismos que tengan la mutación en el codón 86 (Zirnstein et al., 2000).

El objetivo de este estudio fue eliminar la necesidad de utilizar dos técnicas distintas mediante una única prueba capaz de diferenciar microorganismos sensibles y resistentes sin distinción de especie, evitándose la necesidad de la identificación previa. Con este fin, se diseñaron 4 cebadores (gJC-F, gJC-R, sWT-F y sMU-R) que permiten la amplificación de un producto de PCR de 330 pb en todos los microorganismos, tanto en *C. jejuni* como en *C. coli*, además de un producto de 110 pb, en aquellos casos en los que existiera mutación en el gen *gyrA*, o bien de 160 pb cuando se tratara del genotipo silvestre o sensible a la ciprofloxacina. En este trabajo se muestra como esta nueva técnica, denominada MAMA-DEG PCR, funciona inequívocamente con un gran número de cepas, de origen humano y animal, incluyendo todas las combinaciones de especie/fenotipo, *C. jejuni* o *C. coli* y sensibles o resistentes a la ciprofloxacina. Además, a diferencia de las técnicas de MAMA-PCR descritas previamente (Zirnstein et al., 1999 y 2000), la MAMA-DEG PCR funciona correctamente utilizándose como fuente de material genético los hervidos crudos obtenidos directamente a partir del crecimiento bacteriano.

La ciprofloxacina no fue efectiva para inhibir el crecimiento de un 85,1% de las cepas *Campylobacter* analizadas en este trabajo, un 85.8% de *C. jejuni* y un 71.4% de *C. coli*. Estos datos se han obtenido considerando el valor de “breakpoint” de 4 µg/mL (CLSI, 2010), lo que contrasta con los valores superiores de resistencia previamente descritos por la EFSA (EFSA, 2013), que

señalan a España como el miembro de la UE que presenta la mayor tasa de resistencia a la ciprofloxacina en aislados de *C. jejuni* (91.5%) y *C. coli* (94.3), basándose en el punto de corte epidemiológico (ECOFF) de 0.5 µg/mL. Considerando este valor de ECOFF, entre los aislados de humanos analizados en este trabajo hay 8 cepas de *C. jejuni* y 1 cepa de *C. coli* que, estando en el límite de la resistencia (valores de CMI de 1 y 2 µg/ml, respectivamente), no presentarían el determinante C-257-T de *gyrA*. La explicación del fenotipo de estas cepas habría que formularla en el terreno, hipotético, de la sobreexpresión de bombas de eflujo, como ha sido descrito en algunas cepas de *Campylobacter* (Alfredson y Korolik, 2007).

Los aislados de *Campylobacter* procedentes de humanos analizados en este trabajo presentan diversidad de orígenes, considerando los tres hospitales de procedencia y el periodo de 3 años (2010-2012) durante el que se obtuvieron las cepas. Además de incluir las dos especies, *C. jejuni* y *C. coli*, el conjunto de cepas analizado incluye todo un espectro de diferentes combinaciones fenotípicas y genotípicas, según los perfiles de resistencia frente a los antimicrobianos y los genotipos de resistencia determinados para la tetraciclina y la estreptomicina, lo que sugiere la existencia de una importante diversidad genética que sirve para apoyar la efectividad del funcionamiento de la técnica MAMA-DEG PCR.

La técnica MAMA-DEG PCR se ha validado también sobre cepas de *Campylobacter* de origen animal, seleccionados aleatoriamente y caracterizadas en diferentes laboratorios. Así, los 34 aislados de origen aviar fueron resistentes a ciprofloxacina, incluyendo 16 *C. jejuni* y 18 *C. coli*, al igual que 34 de los 38 *C. coli* de porcino, 19 de los 31 *C. jejuni* y los 3 *C. coli* de bovino, mientras que 14 *C. jejuni* de bovino fueron susceptibles. De manera similar a los aislados de humanos, España es el país de la UE con el nivel más alto de Resistencia a la ciprofloxacina en cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos “broilers”, con un 90.3% de resistencia en *C. jejuni* y un 94.1% en *C. coli* (EFSA, 2013), lo que se ha relacionado con la presión selectiva ejercida por el uso como agente terapéutico de las fluoroquinolonas in granjas de producción avícola (Delsol et al., 2004; Wieczorek and Osek, 2013). Aunque el número de

aislados animales analizados en este trabajo es demasiado bajo para extraer conclusiones epidemiológicas, la heterogeneidad de su origen permite considerarlas suficientemente diversas como para poder contribuir a la validación de la técnica MAMA-DEG PCR establecida en este trabajo, corroborando que existe, también en las cepas de origen animal, una correspondencia absoluta entre la detección del polimorfismo C-257-T del gen *gyrA* y la existencia de fenotipos de sensibilidad o resistencia a ciprofloxacina.

8.4 Análisis de la resistencia a la estreptomicina

En este estudio se han detectado tres niveles de resistencia a la estreptomicina, que presentaron distintos mecanismos de resistencia: dos cepas con una CMI >512 µg/ml, siete cepas con CMI comprendida entre 32-256 µg/ml y siete cepas con un valor de CMI=8 µg/ml.

Los análisis moleculares efectuados indican que la resistencia a concentraciones máximas del antimicrobiano (CMI >512 µg/ml), que únicamente se detecta en dos cepas de *C. jejuni*, se debe a la mutación A-130-G del gen *rpsL*, que origina la variante K43R de la proteína codificada, mientras que los microorganismos con menores CMIs carecen de ellas. La asociación entre ambos caracteres, resistencia máxima a la estreptomicina y mutación K43R de RpsL se había ya observado en cepas de *C. coli* aisladas en Finlandia (Olkola et al., 2010), por lo que el presente trabajo extiende esta situación a cepas de *C. jejuni* procedentes de humanos en España.

En este trabajo se describe una nueva subfamilia de ANT(6), denominada ANT(6)-Ie de acuerdo a la nomenclatura previamente establecida (Abril et al., 2010). Los genes que codifican ANT(6)-Ie se detectan en los genomas descritos de cepas de *Campylobacter*, tanto *C. jejuni* como *C. coli*, con una frecuencia similar a la prevalencia de la resistencia a la estreptomicina, detectada en este y otros trabajos, que oscila entre un 5-10 % de los casos.

Entre las cepas de *Campylobacter* resistentes a la estreptomicina analizadas en este trabajo, el gen *ant(6)-Ia* sólo se ha detectado en una cepa, el gen *ant(6)-Iben* en dos cepas, mientras que el gen *ant(6)-Ie* se ha detectado en

7 cepas, 3 *C. coli* y 4 *C. jejuni*, siendo una de éstas la misma que también contiene un gen *ant(6)-Ib*.

Siendo el gen *ant(6)-Ie* el determinante de resistencia a la estreptomicina más prevalente entre las cepas de *Campylobacter* aisladas de humanos analizadas en este trabajo, se analizó en detalle su estructura génica. Así se pudo comprobar que la secuencia codificante de este gen está interrumpida por una delección que provoca una prematura parada de la traducción, y por tanto una proteína truncada que no debería ser funcional. En dos de estas cepas se había ya detectado la mutación K43R de la proteína RpsL, lo que explicaría su fenotipo. Por el contrario, las secuencias codificantes deducidas para la proteína ANT(6)-Ie en las 3 cepas de *C. coli* no presentan esta misma delección, siendo una de ellas la que se expresó funcionalmente en *E. coli*, y correspondiendo por tanto, probablemente a su determinante de resistencia a la estreptomicina.

La proteína ANT(6)-Ie de la cepa HNA157, utilizada para la expresión funcional en *E. coli*, presenta un polimorfismo (C-466-T) que origina la variante P156S de la proteína codificada. Este cambio de Pro por Ser es muy poco conservativo, por lo que podría tener consecuencias sobre la actividad de la proteína. De hecho, la cepa HNA157 es la que tiene una menor CMI para la estreptomicina, si se consideran las 3 cepas de *C. coli* analizadas. No obstante, si se analiza la conservación de este residuo en la familia ANT(6), se observa que aparece un residuo muy similar a la Ser (Thr) en alguno de los miembros, por lo que parece probable que este cambio no tenga efectos muy drásticos sobre la funcionalidad de esta proteína.

Un último grupo de cepas, entre las resistentes a la estreptomicina analizadas en este trabajo, no presentan determinantes de resistencia conocidos. Aquí se incluye la cepa HCC86, única *C. jejuni* que, expresando niveles relativamente altos de resistencia, no presenta mutación en RpsL ni genes *ant(6)* funcionales, ya que tiene truncada por delección la secuencia codificante de ANT(6)-Ie. También habría que considerar aquí el grupo de 7 cepas tanto de *C. jejuni* como de *C. coli*, en las que, con una CMI de 8 µg/ml para la estreptomicina, no se detecta ningún determinante de resistencia, ni

siquiera la posible presencia de *int1* ni sus cassettes génicas asociadas, entre las que se había descrito la presencia de genes de la familia *ant(3'')* que confieren resistencia a la estreptomicina en enterobacterias y que habían sido detectados en cepas de *Campylobacter* aisladas en Irlanda (O'Halloran et al., 2004). En estas cepas, la resistencia a la estreptomicina podría deberse a la sobreexpresión de bombas de eflujo, como ha sido descrito en algunas cepas de *Campylobacter* (Alfredson y Korolik, 2007).

8.5 Conclusiones

- Entre las cepas de *Campylobacter* de origen humano analizadas en este trabajo, los únicos antimicrobianos que son altamente efectivos son la eritromicina y la gentamicina.
- La baja susceptibilidad a la tetraciclina (CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) es muy frecuente entre los aislados de *Campylobacter* de origen humano, siendo su único determinante de resistencia la presencia del gen *tetO*, diagnosticable mediante cebadores específicos, o de la quimera *tetO/tetM/tetO*, que debe revelarse mediante la amplificación con cebadores degenerados.
- La resistencia a la tetraciclina es, en al menos una de las cepas de *Campylobacter* analizadas en este trabajo, movilizable mediante conjugación, por lo que su determinante de resistencia (*tetO*) tiene localización plasmídica.
- La técnica MAMA-DEG PCR desarrollada en este trabajo distingue de manera inequívoca el polimorfismo C-257-T del gen *gyrA* de *Campylobacter* termofílicos, que confiere resistencia a la ciprofloxacina (CMI ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), sin requerir la identificación previa de sus especies mayoritarias, *C. jejuni* y *C. coli*.
- La mutación R43K de la proteína RpsL de *C. jejuni* confiere valores de resistencia máxima (CMI ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$) a la estreptomicina.
- Una nueva subfamilia de genes *ant(6)*, *ant(6)-Ie*, que confiere resistencia a la estreptomicina, existe en *C. jejuni* y *C. coli*, siendo funcionales los homólogos detectados únicamente en cepas de *C. coli*.

9. Bibliografía.

Bibliografía

- AARESTRUP, F. M. & ENGBERG, J. 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res*, 32, 311-21.
- ABRIL, C., BRODARD, I. & PERRETEN, V. 2010. Two novel antibiotic resistance genes, tet(44) and ant(6)-Ib, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 3052-5.
- ADLER-MOSCA, H., LUTHY-HOTTENSTEIN, J., MARTINETTI LUCCHINI, G., BURNENS, A. & ALTWEGG, M. 1991. Development of resistance to quinolones in five patients with campylobacteriosis treated with norfloxacin or ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 10, 953-7.
- AKIBA, M., LIN, J., BARTON, Y. W. & ZHANG, Q. 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother*, 57, 52-60.
- ALFREDSON, D. A. & KOROLIK, V. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 277, 123-32.
- ALONSO, R., MATEO, E., GIRBAU, C., CHURRUCA, E., MARTINEZ, I. & FERNANDEZ-ASTORGA, A. 2004. PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4886-8.
- ALTEKRUSE, S. F. & TOLLEFSON, L. K. 2003. Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. *J Am Vet Med Assoc*, 223, 445-52.
- ALLOS, B. M. 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*, 32, 1201-6.
- ALLOS, B. M. & BLASER, M. J. 1995. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *Clin Infect Dis*, 20, 1092-9; quiz 1100-1.
- AQUINO, M. H., FILGUEIRAS, A. L., FERREIRA, M. C., OLIVEIRA, S. S., BASTOS, M. C. & TIBANA, A. 2002. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Lett Appl Microbiol*, 34, 149-53.

- ATTERBURY, R. J., CONNERTON, P. L., DODD, C. E., REES, C. E. & CONNERTON, I. F. 2003. Isolation and characterization of Campylobacter bacteriophages from retail poultry. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4511-8.
- AVRAIN, L., VERNOSY-ROZAND, C. & KEMPF, I. 2004. Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between Campylobacter jejuni strains in chickens. *J Appl Microbiol*, 97, 134-40.
- BACKERT, S., BOEHM, M., WESSLER, S. & TEGTMEYER, N. 2013. Transmigration route of Campylobacter jejuni across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Commun Signal*, 11, 72.
- BACON, D. J., ALM, R. A., BURR, D. H., HU, L., KOPECKO, D. J., EWING, C. P., TRUST, T. J. & GUERRY, P. 2000. Involvement of a plasmid in virulence of Campylobacter jejuni 81-176. *Infect Immun*, 68, 4384-90.
- BARBOSA, T. M., SCOTT, K. P. & FLINT, H. J. 1999. Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, tet(W), isolated from Butyrivibrio fibrisolvens, and the occurrence of tet(O) in ruminal bacteria. *Environ Microbiol*, 1, 53-64.
- BATCHELOR, R. A., PEARSON, B. M., FRIIS, L. M., GUERRY, P. & WELLS, J. M. 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different Campylobacter species. *Microbiology*, 150, 3507-17.
- BESSEDE, E., SOLECKI, O., SIFRE, E., LABADI, L. & MEGRAUD, F. 2011. Identification of Campylobacter species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 17, 1735-9.
- BOYD, D., PETERS, G. A., CLOECKAERT, A., BOUMEDINE, K. S., CHASLUS-DANCLA, E., IMBERECHTS, H. & MULVEY, M. R. 2001. Complete Nucleotide Sequence of a 43-Kilobase Genomic Island Associated with the Multidrug Resistance Region of Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104 and Its Identification in Phage Type DT120 and Serovar Agona. *Journal of Bacteriology*. 183(19):5725-5732.
- CALLICOTT, K. A., HARGARDOTTIR, H., GEORGSSON, F., REIERSEN, J., FRIGRIKSDOTTIR, V., GUNNARSSON, E., MICHEL, P., BISAILLON, J. R., KRISTINSSON, K. G., BRIEM, H., HIETT, K. L., NEEDLEMAN, D. S. & STERN, N. J.

2008. Broiler *Campylobacter* contamination and human campylobacteriosis in Iceland. *Appl Environ Microbiol*, 74, 6483-94.
- CAMPOS, M. J., PALOMO, G., HORMENO, L., UGARTE, M., PORRERO, M. C., HERRERA-LEON, S., VADILLO, S., PIRIZ, S. & QUESADA, A. 2013. Co-occurrence of ACSSuT and cephalosporin resistance phenotypes is mediated by int1-associated elements in nontyphoidal *Salmonella enterica* from human infections in Spain. *Microb Drug Resist*, 19, 384-91.
- CANCHO, B., GARCÍA, M.S., SIMAL, J. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3(1), 39-47.
- CHEN, I., CHRISTIE, P. J. & DUBNAU, D. 2005. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science*, 310, 1456-60.
- CHOPRA, I. & ROBERTS, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 232-60 ; second page, table of contents.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing".
- CONNELL, S. R., TRACZ, D. M., NIERHAUS, K. H. & TAYLOR, D. E. 2003a. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3675-81.
- CONNELL, S. R., TRIEBER, C. A., DINOS, G. P., EINFELDT, E., TAYLOR, D. E. & NIERHAUS, K. H. 2003b. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J*, 22, 945-53.
- CRESPO, M. D., OLSON, J. W., ALTERMANN, E., SILETZKY, R. M. & KATHARIOU, S. 2012. Chromosomal tet(O)-harboring regions in *Campylobacter coli* isolates from turkeys and swine. *Appl Environ Microbiol*, 78, 8488-91.
- DASTI, J. I., GROSS, U., POHL, S., LUGERT, R., WEIG, M. & SCHMIDT-OTT, R. 2007. Role of the plasmid-encoded tet(O) gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol*, 56, 833-7.
- DAVIES, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375-82.

Bibliografía

- DAVIES, J. & WRIGHT, G. D. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol*, 5, 234-40.
- DE BOER, P., WAGENAAR, J. A., ACHTERBERG, R. P., VAN PUTTEN, J. P., SCHOULS, L. M. & DUIM, B. 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Mol Microbiol*, 44, 351-9.
- DELSOL, A.A., SUNDERLAND, J., WOODWARD, M.J., PUMBWE, L., PIDDOCK, L.J. & ROE, J.M. (2004). Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, 53, 872-4.
- DIONISI, A. M., LUZZI, I. & CARATTOLI, A. 2004. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* and analysis of the *gyrA* gene by the LightCycler mutation assay. *Mol Cell Probes*, 18, 255-61.
- DORRELL, N., MANGAN, J. A., LAING, K. G., HINDS, J., LINTON, D., AL-GHUSEIN, H., BARRELL, B. G., PARKHILL, J., STOKER, N. G., KARLYSHEV, A. V., BUTCHER, P. D. & WREN, B. W. 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res*, 11, 1706-15.
- DUBNAU, D. & PROVVEDI, R. 2000. Internalizing DNA. *Res Microbiol*, 151, 475-80.
- DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K-H., STACKEBRANDT, E. (2006). *The Prokaryotes*. Singapore: Springer.
- EFSA (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. Parma: The EFSA Journal.
- EFSA (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. Parma: The EFSA Journal.
- ENDTZ, H. P., RUIJS, G. J., VAN KLINGEREN, B., JANSEN, W. H., VAN DER REYDEN, T. & MOUTON, R. P. 1991. Quinolone resistance in *campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother*, 27, 199-208.

- ENGBERG, J., AARESTRUP, F. M., TAYLOR, D. E., GERNER-SMIDT, P. & NACHAMKIN, I. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis*, 7, 24-34.
- EPPS, S. V., HARVEY, R. B., HUME, M. E., PHILLIPS, T. D., ANDERSON, R. C. & NISBET, D. J. 2013. Foodborne campylobacter: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *Int J Environ Res Public Health*, 10, 6292-304.
- FUNATSU, G. & WITTMANN, H. G. 1972. Ribosomal proteins. 33. Location of amino-acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin. *J Mol Biol*, 68, 547-50.
- FROST, L. S., LEPLAE, R., SUMMERS, A. O. & TOUSSAINT, A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*, 3, 722-32.
- GARRITY, G.M., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Nueva York: Springer.
- GAUDREAU, C. & GILBERT, H. 1998. Antimicrobial resistance of clinical strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 2106-8.
- GIBREEL, A., TRACZ, D. M., NONAKA, L., NGO, T. M., CONNELL, S. R. & TAYLOR, D. E. 2004. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3442-50.
- GIBREEL, A., SJOREN, E., KAIJSER, B., WRETLIND, B. & SKOLD, O. 1998. Rapid emergence of high-level resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* associated with mutational changes in *gyrA* and *parC*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 42, 3276-8.
- GUERRY, P., YAO, R., ALM, R. A., BURR, D. H. & TRUST, T. J. 1994. Systems of experimental genetics for *Campylobacter* species. *Methods Enzymol*, 235, 474-81.
- HART, W. S., HEUZENROEDER, M. W. & BARTON, M. D. 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51, 216-21.

Bibliografía

- HERMANS, D., PASMANS, F., MESSENS, W., MARTEL, A., VAN IMMERSEEL, F., RASSCHAERT, G., HEYNDRICKX, M., VAN DEUN, K. & HAESEBROUCK, F. 2012. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12, 89-98.
- JACOBY, G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 2, S120-6.
- JEON, B., MURAOKA, W., SAHIN, O. & ZHANG, Q. 2008. Role of Cj1211 in natural transformation and transfer of antibiotic resistance determinants in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2699-708.
- JESSE, T. W., ENGLIN, M. D., PITTENGER-ALLEY, L. G. & FEDORKA-CRAY, P. J. 2006. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *J Appl Microbiol*, 100, 682-8.
- KHAKHRIA, R. & LIOR, H. 1992. Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol Infect*, 108, 403-14.
- KURINCIC, M., KLANCNIK, A. & SMOLE MOZINA, S. 2012. Effects of efflux pump inhibitors on erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline resistance in *Campylobacter* spp. isolates. *Microb Drug Resist*, 18, 492-501.
- LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A., PAAUW, A., BOX, A.T., BLOK, H. E., VERHOEF, J. & FLUIT, A. C. 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3038-3040.
- LEE, C. Y., TAI, C. L., LIN, S. C. & CHEN, Y. T. 1994. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. *Int J Food Microbiol*, 24, 161-70.
- LEE, M. D., SANCHEZ, S., ZIMMER, M., IDRIS, U., BERRANG, M. E. & MCDERMOTT, P. F. Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3660-4.
- LEVESQUE, C., PICHE, L., LAROSE, C. & ROY, P.H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 185-191.

- LI, W., ATKINSON, G. C., THAKOR, N. S., ALLAS, U., LU, C. C., CHAN, K. Y., TENSON, T., SCHULTEN, K., WILSON, K. S., HAURYLIUK, V. & FRANK, J. 2013. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat Commun*, 4, 1477.
- LIN, J., MICHEL, L. O. & ZHANG, Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2124-31.
- LUANGTONGKUM, T., JEON, B., HAN, J., PLUMMER, P., LOGUE, C. M. & ZHANG, Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol*, 4, 189-200.
- LUCEY, B., CROWLEY, D., MOLONEY, P., CRYAN, B., DALY, M., O'HALLORAN, F., THRELFALL, E. J. & FANNING, S. 2000a. Integronlike structures in *Campylobacter* spp. of human and animal origin. *Emerg Infect Dis*, 6, 50-5.
- LUCEY, B., FEURER, C., GREER, P., MOLONEY, P., CRYAN, B. & FANNING, S. 2000b. Antimicrobial resistance profiling and DNA Amplification Fingerprinting (DAF) of thermophilic *Campylobacter* spp. in human, poultry and porcine samples from the Cork region of Ireland. *J Appl Microbiol*, 89, 727-34.
- MAN, S. M. 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8, 669-85.
- MAXWELL, A. 1992. The molecular basis of quinolone action. *J Antimicrob Chemother*, 30, 409-14.
- MCVEY, D.S., KENNEDY, M. & CHENGAPPA, M.M. (20 Análisis de la resistencia a la 13). *Veterinary Microbiology*. Ames: Wiley-Blackwell.
- MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M. & TAUXE, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 5, 607-25.
- MEIER, A., SANDER, P., SCHAPER, K. J., SCHOLZ, M. & BOTTGER, E. C. 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40, 2452-4.

Bibliografía

- MOORE, J. E., BARTON, M. D., BLAIR, I. S., CORCORAN, D., DOOLEY, J. S., FANNING, S., KEMPF, I., LASTOVICA, A. J., LOWERY, C. J., MATSUDA, M., MCDOWELL, D. A., MCMAHON, A., MILLAR, B. C., RAO, J. R., ROONEY, P. J., SEAL, B. S., SNELLING, W. J. & TOLBA, O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect*, 8, 1955-66.
- NACHAMKIN, I., ALLOS, B. M. & HO, T. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol Rev*, 11, 555-67.
- NACHAMKIN, I., UNG, H. & LI, M. 2002. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis*, 8, 1501-3.
- NORMARK, B. H. & NORMARK, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*, 252, 91-106.
- OBENG, A. S., RICKARD, H., SEXTON, M., PANG, Y., PENG, H. & BARTON, M. 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *J Appl Microbiol*, 113, 294-307.
- O'HALLORAN, F., LUCEY, B., CRYAN, B., BUCKLEY, T. & FANNING, S. 2004. Molecular characterization of class 1 integrons from Irish thermophilic *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 53(6):952-7.
- OLKKOLA, S., JUNTUNEN, P., HEISKA, H., HYYTIAINEN, H. & HANNINEN, M. L. 2010. Mutations in the *rpsL* gene are involved in streptomycin resistance in *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist*, 16, 105-10.
- PADUNGTON, P. & KANEENE, J. B. 2003. *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J Vet Med Sci*, 65, 161-70.
- PAYOT, S., BOLLA, J. M., CORCORAN, D., FANNING, S., MEGRAUD, F. & ZHANG, Q. 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect*, 8, 1967-71.
- PEREZ-BOTO, D., LOPEZ-PORTOLES, J. A., SIMON, C., VALDEZATE, S. & ECHEITA, M. A. 2010. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J Antimicrob Chemother*, 65, 2083-8.

- PETERSEN, L., LARSEN, T. S., USSERY, D.W., ON, S.L. & KROGH A. 2003. RpoD promoters in *Campylobacter jejuni* exhibit a strong periodic signal instead of a -35 box. *J Mol Biol*, 326(5), 1361-72.
- PICCIRILLO, A., DOTTO, G., SALATA, C. & GIACOMELLI, M. 2013. Absence of class 1 and class 2 integrons among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in Italy. *J Antimicrob Chemother*, 68, 2683-5.
- POEHLGAARD, J. & DOUTHWAITE, S. 2005. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 3, 870-81.
- PRATS, G., MIRELIS, B., LLOVET, T., MUNOZ, C., MIRO, E. & NAVARRO, F. 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1140-5.
- PRATT, A. & KOROLIK, V. 2005. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Antimicrob Chemother*, 55, 452-60.
- QIN, S., WANG, Y., ZHANG, Q., CHEN, X., SHEN, Z., DENG, F., WU, C. & SHEN, J. 2012. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 5332-9.
- RUIZ-PALACIOS, G. M. 2007. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clin Infect Dis*, 44, 701-3.
- SAM, W. I., LYONS, M. M. & WAGHORN, D. J. 1999. Increasing rates of ciprofloxacin resistant campylobacter. *J Clin Pathol*, 52, 709.
- SCALLAN, E., GRIFFIN, P. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V. & HOEKSTRA, R. M. 2011a. Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. *Emerg Infect Dis*, 17, 16-22.
- SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. A., ROY, S. L., JONES, J. L. & GRIFFIN, P. M. 2011b. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17, 7-15.
- SCHMIDT-OTT, R., POHL, S., BURGHARD, S., WEIG, M. & GROSS, U. 2005. Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. *J Infect*, 50, 12-21.

- SEBALD, M. & VERON, M. 1963. [Base DNA Content and Classification of Vibrios]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 105, 897-910.
- SHAW, K. J., RATHER, P. N., HARE, R. S. & MILLER, G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbial Rev*, 57, 138-63.
- SUMMERS, A. O. 2006. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Anim Biotechnol*, 17, 125-35.
- TAKATA, T., FUJIMOTO, S. & AMAKO, K. 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect Immun*, 60, 3596-600.
- TAYLOR, D. E., DE GRANDIS, S. A., KARMALI, M. A. & FLEMING, P. C. 1981. Transmissible plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 19, 831-5.
- TAYLOR, D. N., SANCHEZ, J. L., CANDLER, W., THORNTON, S., MCQUEEN, C. & ECHEVERRIA, P. 1991. Treatment of travelers' diarrhea: ciprofloxacin plus loperamide compared with ciprofloxacin alone. A placebo-controlled, randomized trial. *Ann Intern Med*, 114, 731-4.
- TENOVER, F. C., WILLIAMS, S., GORDON, K. P., NOLAN, C. & FLORDE, J. J. 1985. Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 27, 37-41.
- TORII, N., NOZAKI, T., MASUTANI, M., NAKAGAMA, H., SUGIYAMA, T., SAITO, D., ASAKA, M., SUGIMURA, T. & MIKI, K. 2003. Spontaneous mutations in the *Helicobacter pylori* rpsL gene. *Mutat Res*, 535, 141-5.
- UGARTE-RUIZ, M., GOMEZ-BARRERO, S., PORRERO, M. C., ALVAREZ, J., GARCIA, M., COMERON, M. C., WASSENAAR, T. M. & DOMINGUEZ, L. 2012. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *J Appl Microbiol*, 113, 200-8.
- VAKULENKO, S. B. & MOBASHERY, S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*, 16, 430-50.
- VAN DEN BOGAARD, A. E. 1997. Antimicrobial resistance--relation to human and animal exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 40, 453-4.

Bibliografía

- VAN DEN BOGAARD, A. E. & STOBBERINGH, E. E. 1999. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, 58, 589-607.
- VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., SMITH, H., VELDMAN, K. & MEVIUS, D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 59(4):746-50.
- VELAZQUEZ, J. B., JIMENEZ, A., CHOMON, B. & VILLA, T. G. 1995. Incidence and transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother*, 35, 173-8.
- VIDAL, A. (2005) Salmonelosis porcina: monitorización y bases para su control. Patología Animal (Sanidad Animal). León, University of León.
- WANG, W., GUO, Q., XU, X., SHENG, Z. K., YE, X. & WANG, M. 2014. High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps Tet(A) and Tet(A)-1 with two start codons. *J Med Microbiol*, 63, 1454-9.
- WANG, Y. & TAYLOR, D. E. 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *J Bacteriol*, 172, 949-55.
- WANG, Y. & ZHANG, Y. 2014. Regulation of TET protein stability by calpains. *Cell Rep*, 6, 278-84.
- WASSENAAR, T. M. & BLASER, M. J. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect*, 1, 1023-33.
- WEBBER, M. A. & PIDDOCK, L. J. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51, 9-11.
- WIECZOREK, K. & OSEK, J. 2013. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed Res Int*, 2013, 340605.
- YAMAZAKI-MATSUNE, W., TAGUCHI, M., SETO, K., KAWAHARA, R., KAWATSU, K., KUMEDA, Y., KITAZATO, M., NUKINA, M., MISAWA, N. & TSUKAMOTO, T. 2007. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J Med Microbiol*, 56, 1467-73.

Bibliografía

ZIRNSTEIN, G., HELSEL, L., LI, Y., SWAMINATHAN, B. & BESSER, J. 2000. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 190, 1-7.

ZIRNSTEIN, G., LI, Y., SWAMINATHAN, B. & ANGULO, F. 1999. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol*, 37, 3276-80.

